



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

# **Resolvina-D1 a través del receptor ALX/FPR2 aumenta la síntesis de colágeno en miofibroblastos cardiacos de rata adulta**

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

**Esteban Alejandro Castro Carrasco**

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

---

Santiago, Chile, 2019

## **FINANCIAMIENTO**

El desarrollo de esta memoria de título se realizó en el Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento del proyecto FONDECYT N° 1170425.

Esta memoria originó la siguiente presentación en congreso:

Resolvina-D1 a través del receptor ALX/FPR2 aumenta la síntesis de colágeno en miofibroblastos cardiacos de rata adulta. **Castro-Carrasco, E.**; Lillo, JM.; Díaz-Araya, G. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Concepción, Chile, noviembre 2019.

*Para ese niño que soñaba con ser grande.*

## AGRADECIMIENTOS

Cada meta se alcanza tras un camino recorrido. Y acá se plasma una de las primeras grandes metas de mi vida, que después de un difícil y largo caminar al fin se logra.

Quizá no sea el sueño de todos, pero debo reconocer que desde niño siempre quise este momento, aunque en esa inocencia no sabía qué es lo que en verdad quería; pero hoy ese niño del pasado me da las gracias por haber llegado hasta acá, y yo le doy las gracias por haberme guiado.

Es difícil agradecer cuando te das cuenta de que el camino es más largo de lo que parece, que cada decisión que tomaste en tu vida te ha llevado al momento que estás viviendo, pero intentaré dar las gracias a todos quienes de alguna manera son parte de esto.

A mi familia, Papá, Mamá, Silvia, Alexis, pues sin ellos no sería la persona que soy hoy, gracias por haberme guiado, y no faltarme nunca; ustedes son el pilar de mi vida.

A Camila, compañera de camino, que sigues ahí a pesar de cada caída, a pesar de cada momento difícil, aprendimos a levantarnos el uno al otro, y te agradezco por ser mi soporte cuando sentí no poder más, gracias por hacer más linda y fácil esta etapa. A sus padres, por acogerme y entregarme cariño como un integrante más de su familia, a su hermano, Bryan, por ser un gran pequeño amigo que me ayuda a recordar lo que a veces se olvida sobre ser feliz.

A todos los profesores que pasaron por mi vida, especialmente a mis queridas profesoras Nancy Gonzalez y Verónica Garrido, quienes me enseñaron a amar la química desde el primer momento en que la conocí.

A toda mi gente de handball, que cada sábado nos acompañábamos dándolo todo en nuestros partidos, y al Matías, por enseñarme todo lo que sé del deporte, y abrir este espacio en mi vida que siempre ayuda a escapar un rato de la monotonía.

A mi querida gente del CDE, que fueron el mejor equipo de trabajo que pude tener, gracias por el compromiso demostrado al haber logrado todo lo que nos propusimos, y gracias por seguir aquí, entregando aún risas y alegrías.

A todo el Laboratorio de Farmacología, por siempre estar ahí para ayudar en lo que se necesite, y ser un gran equipo de trabajo a pesar de cualquier dificultad. Y al igual que a don Jose, a Evelyn, y auxiliares que facilitan la vida de quienes trabajamos acá Finalmente, agradecer al profesor Guillermo Díaz, por todo el apoyo y consejos entregados para sacar esta tesis adelante, por hacer ver siempre el vaso medio lleno, aunque uno lo viera vacío.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

FINANCIAMIENTO .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	4
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ABREVIATURAS .....	8
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	11
1.- INTRODUCCIÓN .....	13
1.1.- Generalidades .....	13
1.2.- Fibroblastos cardíacos .....	13
1.3.- Miofibroblasto Cardíaco.....	14
1.4.- Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) .....	15
1.4.1.- Alfa- actina del músculo liso (α-SMA) .....	17
1.5.- Participación de fibroblastos y miofibroblastos en la secreción de proteínas de matriz extracelular.....	17
1.5.1.-Colágeno.....	18
1.6.-Vías de señalización que participan en la síntesis y secreción de colágeno.....	18
1.7.-Resolvina D1 (RvD1).....	19
1.8.-. Receptor ALX/FPR2.....	20
1.9.- Participación de RvD1 y ALX/FPR2 en la secreción de colágeno.....	20
2.- HIPÓTESIS .....	23
3.- OBJETIVO GENERAL .....	23
4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
5.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
5.1.- Reactivos .....	24
5.2.- Modelo animal.....	24
5.3.- Aislamiento de fibroblastos cardíacos .....	25
5.4.- Pasaje celular .....	25
5.5.- Diferenciación de FC a MFC.....	25
5.6.- Western Blot.....	27
5.7.- Análisis estadístico .....	27
6.- RESULTADOS .....	28
6.1.-Expresión del receptor ALX/FPR2 en FC.....	28

6.2.- Diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos por TGF- $\beta$ .....	29
6.3.- Vías de señalización activadas por RvD1 en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos.....	30
6.4.- Efecto de RvD1 sobre la síntesis de colágeno en FC .....	33
6.5.- Efecto de RvD1 sobre la síntesis de colágeno I en MFC .....	34
6.6.- Efecto de RvD1 en la expresión de colágeno en MFC autoinducidos .....	38
7.- DISCUSIÓN .....	40
7.1.- TGF- $\beta$ 1 induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y paralelamente un aumento en la expresión del del receptor ALX/FPR2 .....	41
7.2.- Evaluación de las vías de señalización estimuladas por RvD1 .....	43
7.3.- Efecto de RvD1 sobre la síntesis de colágeno en FC y MFC.....	44
7.4.- Evaluación de la síntesis de colágeno en MFC autoinducidos .....	47
8.- ESQUEMA RESUMEN .....	49
9.- CONCLUSIONES .....	50
10.- BIBLIOGRAFÍA .....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones celulares de fibroblastos cardiacos .....	15
Figura 2. Resumen de factores que afectan la diferenciación de Fibroblasto a Miofibroblasto.....	17
Figura 3. Procedimiento experimental de tiempos de plaqueo y estímulos en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos .....	26
Figura 4. Niveles de expresión del receptor ALX/FPR2 ante estímulos LPS, TGF- $\beta$ , ANG II y RvD1...28	
Figura 5. Efecto de TGF $\beta$ 1 sobre los niveles de $\alpha$ -SMA en FC.....	30
Figura 6. Activación de vía ERK1/2 en FC y MFC.....	31
Figura 7. Activación diferenciada de vía PI3K/AKT en FC y MFC.....	32
Figura 8. Efecto del tiempo y de RvD1 en los niveles de expresión de colágeno I.....	33
Figura 9. Expresión de colágeno ante estímulo con RvD1 por 24, 48 y 72 horas.....	34
Figura 10. Inhibición de la expresión de colágeno estimulado por RvD1 con WRW4 .....	35
Figura 11. Inhibición parcial de la expresión de colágeno estimulado por RvD1 con PD98059 y LY294002.....	37
Figura 12. Tratamiento de los distintos grupos experimentales para el experimento del efecto de RvD1 en la expresión de colágeno I en MFC autoinducidos.....	38
Figura 13. Expresión de colágeno en MFC autoinducidos .....	39
Figura 14. Esquema resumen de los efectos diferenciales de la RvD1 sobre la expresión de colágeno en FC y MFC.....	49

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA	Alfa- smooth muscle actin
ALX/FPR2	Lipoxine A4 Receptor /N-Formyl peptide Receptor 2
ANG II	Angiotensina II
ANOVA	Analysis of Variance
AT-RvD1	Aspirin triggered-Resolvin D1
B1R	Receptor B1 de cininas
B2R	Receptor B2 de cininas
COX-2	Cyclooxygenase-2
DHA	Docosahexaenoic Acid
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Essential Medium-Formula 12
EPA	Eicosapentaenoic Acid
EPAC-1	Exchange factor directly activated by cAMP 1
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinase1/2
FBS/SFB	Fetal Bovine Serum/Suero Fetal Bovino
FC	Fibroblasto Cardíaco
GAPDH	Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa
GPCR	G Protein-coupled Receptor
GPR32	G Protein-couple Receptor 32
I $\kappa$ B $\alpha$	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
LPS	Lipopolisacárido Bacteriano
LXA4	Lipoxina A4
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEC	Matriz Extracelular
MFC	Miofibroblasto Cardíaco
MFC-AI	Miofibroblastos Cardíacos Autoinducidos
MFC-I	Miofibroblastos Cardíacos Inducidos
mRNA	Messenger RNA
NF- $\kappa$ $\beta$	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate-buffered Saline
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol-3-Kinase / Protein Kinase B
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
RAT1	Receptor de angiotensina II tipo 1
ROS	Reactive oxygen species
TGFR1	Tissue Growth Factor 1
TGFR2	Tissue Growth Factor 2
TGF- $\beta$ 1	Tissue Growth Factor beta-1
TLR4	Toll-Like Receptor 4
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
UUO	Unilateral Ureter Obstruction

## **Resolvina-D1 a través del receptor ALX/FPR2 aumenta la síntesis de colágeno en miofibroblastos cardiacos de rata adulta**

### **RESUMEN**

**Introducción:** Las enfermedades cardiovasculares se encuentran directamente relacionadas con un proceso inflamatorio, por lo que entender el proceso de inflamación es esencial para entender dichas enfermedades. En este proceso se encuentran varios agentes, tales como citoquinas, quimioquinas y agentes proresolutivos, los cuales mantienen en regulación dicho proceso, siendo estos últimos quienes limitan mayoritariamente su acción. A nivel cardiaco se ha descrito a los fibroblastos cardiacos (FC) como células que participan de manera activa en todo este proceso, siendo capaces de secretar diversas citoquinas, y de responder a distintos estímulos, tanto proinflamatorios como proresolutivos, además de ser tener la capacidad de diferenciarse a miofibroblastos cardiacos (MFC)

La diferenciación de FC a MFC está mediada principalmente por TGF- $\beta$ 1, el cual se libera ya sea desde células inmunes, por efecto de angiotensina II (ANG II) sobre los mismos FC, o en condiciones *in vitro* por estrés mecánico. Una de las principales diferencias entre el FC y el MFC es que el MFC secreta una mayor cantidad de proteínas de matriz (principalmente colágeno), que el FC, con la finalidad de reparar el tejido cardiaco después de un daño celular. Además, en este proceso de diferenciación FC a MFC se ha demostrado un aumento en la expresión de los receptores B1 de cininas,  $\beta$ 2-Adrenérgico, AT1 de ANG II, etc. Sin embargo, se desconoce qué ocurre con ALX/FPR2 que es el receptor de Resolvina D1 (RvD1). La RvD1 es un mediador lipídico antiinflamatorio y se ha demostrado en otros tipos celulares, que la activación de ALX/FPR2 por su ligando puede modificar los niveles de expresión de proteínas de matriz tales como  $\alpha$ -SMA o colágeno; sin embargo, a nivel de FC y MFC no existe evidencia aún.

**Objetivo:** Determinar que en la diferenciación de FC a MFC de rata adulta existe un aumento en la expresión de ALX/FPR2 y consecuentemente tras su activación por RvD1 se induce un aumento en los niveles de colágeno I.

**Materiales y Métodos:** Cultivo secundario de FC adultos de rata en medio libre de suero por 24 horas fueron estimulados con RvD1 100nM en SFB 1% a distintos tiempos. Por otro lado, también se estimularon con TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) por 72 Horas en SFB 1% con tal de diferenciarlos a MFC. Además, para el trabajo en MFC se eliminó el TGF- $\beta$ 1 tras cambio de medio, se esperó dos horas y se estimuló con RvD1 a distintos tiempos, en presencia y ausencia de inhibidores de vías transduccionales ERK1/2 y PI3K/AKT, así como con el antagonista del receptor ALX/FPR2. Se midieron proteínas ALX/FPR2,  $\alpha$ -SMA, p-ERK1/2, p-AKT y colágeno I mediante Western Blot.

**Resultados:** Tras la diferenciación de FC a MFC de rata adulta, se encontró un aumento en los niveles de expresión del receptor ALX/FPR2. En MFC, la RvD1 activó las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/AKT y aumentó la expresión de colágeno I. Además, el aumento de colágeno causado por RvD1 se vio disminuido en la presencia de los inhibidores de las vías de señalización mencionadas y así como con el antagonista del receptor ALX/FPR2. Por otro lado, RvD1 no disminuyó los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA, lo que sugiere que no revierte el proceso de diferenciación de MFC a FC

**Conclusión:** Nuestros resultados sugieren que la diferenciación de FC a MFC de rata adulta inducida por TGF- $\beta$ 1 aumenta los niveles de expresión de ALX/FPR2. Lo que permite que RvD1 aumente los niveles de expresión de colágeno a través de la activación de su receptor y las vías ERK1/2 y PI3K/AKT.

## **ABSTRACT**

**Background:** Cardiovascular diseases are directly related to an inflammatory process, so understand the inflammation process is essential to understand the diseases. In this process there are several agents, such as cytokines, chemokines and proresolutive agents, which maintain the regulation of this process, the latter being the ones who mostly limit their action. At the cardiac level, cardiac fibroblasts (CF) have been described as cells that actively participate in this whole process, being able to secrete various cytokines, and respond to different stimuli, both proinflammatory and proresolutive, in addition to being able to differentiate to cardiac myofibroblasts (CFM) Cardiac fibroblast CF-to-CMF differentiation is mainly mediated by TGF- $\beta$ 1 released from immune cells by angiotensin II (ANG II) effect, or *in vitro* conditions due to mechanical stress. CMF can produce extracellular matrix proteins, mostly collagen, in the scar formation process. Also, in the CF-to-CMF process it has been demonstrated the upregulation of Kinin-B1 and AT1R receptor, among others. However, the presence of Resolvin D1 (RvD1) receptor, ALX/FPR2, has not been elucidated. RvD1 is an anti-inflammatory lipidic mediator that regulates matrix proteins like  $\alpha$ -SMA and collagen in various cell types, yet there is no evidence of this effect on CMF.

**Purpose:** To demonstrate that the CF-to-CMF of adult rat differentiation increases ALX/FPR2 protein levels, and consequently, ALX/FPR2 activation by RvD1 enhances collagen-1 synthesis.

**Methods:** Secondary culture of adult rat CF was starved for 24 hours, stimulated with RvD1 100nM in FBS 1% at different times. On the other hand, also stimulated with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) for 72 hours on foetal bovine serum (FBS) 1% to induce CMF differentiation and then treated with RvD1 at different intervals in presence and absence of PD98059, LY294002 (ERK1/2 and PI3K/AKT inhibitors) and WRW4 (ALX/FPR2 antagonist). The proteins levels of ALX/FPR2,  $\alpha$ -SMA, p-EKR  $\frac{1}{2}$ , p-AKT and collagen-1 were measured by western blot.

**Results:** After CMF differentiation, it was found an increase of ALX expression. On CMF, RvD1 activated the ERK1/2-PI3K/AKT pathways and enhanced the expression of collagen-1. These effects were blocked by PD98059, LY294002 and WRW4. On the other hand, RvD1 did not decrease  $\alpha$ -SMA protein levels, which suggests that it does not reverse CMF differentiation.

**Conclusions:** Our results suggest that the CF-to-CMF differentiation increases the protein levels of ALX/FPR2, and that RvD1 enhances collagen-1 synthesis through ERK1/2 and PI3K/AKT pathways.

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Generalidades**

Los procesos inflamatorios han sido ampliamente estudiados debido a su directa relación con enfermedades de carácter crónico, incluyendo síndromes metabólicos, enfermedades neurológicas y vasculares. Siempre se había pensado que el proceso de resolución de la inflamación era de carácter pasivo, puesto que terminaría una vez que se comienzan a diluir las proteínas quimioattractantes del medio; sin embargo, fueron descubiertas moléculas que se encargan de manera directa de finalizar este proceso, y así evitar, una inflamación prolongada. Por lo que este proceso de resolución de la inflamación pasó de conocerse como pasivo, a ser de carácter activo [1]. Dichos mediadores, conocidos como mediadores especializados proresolutivos (SPM) abren la puerta a un gran nicho de investigación, puesto que las enfermedades crónicas, según la OMS, son la principal causa de mortalidad a nivel mundial [2], siendo clara la importancia de encontrar nuevos blancos farmacológicos como tratamientos para este tipo de patologías, en este sentido en el corazón células importantes son los fibroblastos cardiacos.

### **1.2 Fibroblasto Cardíaco (FC)**

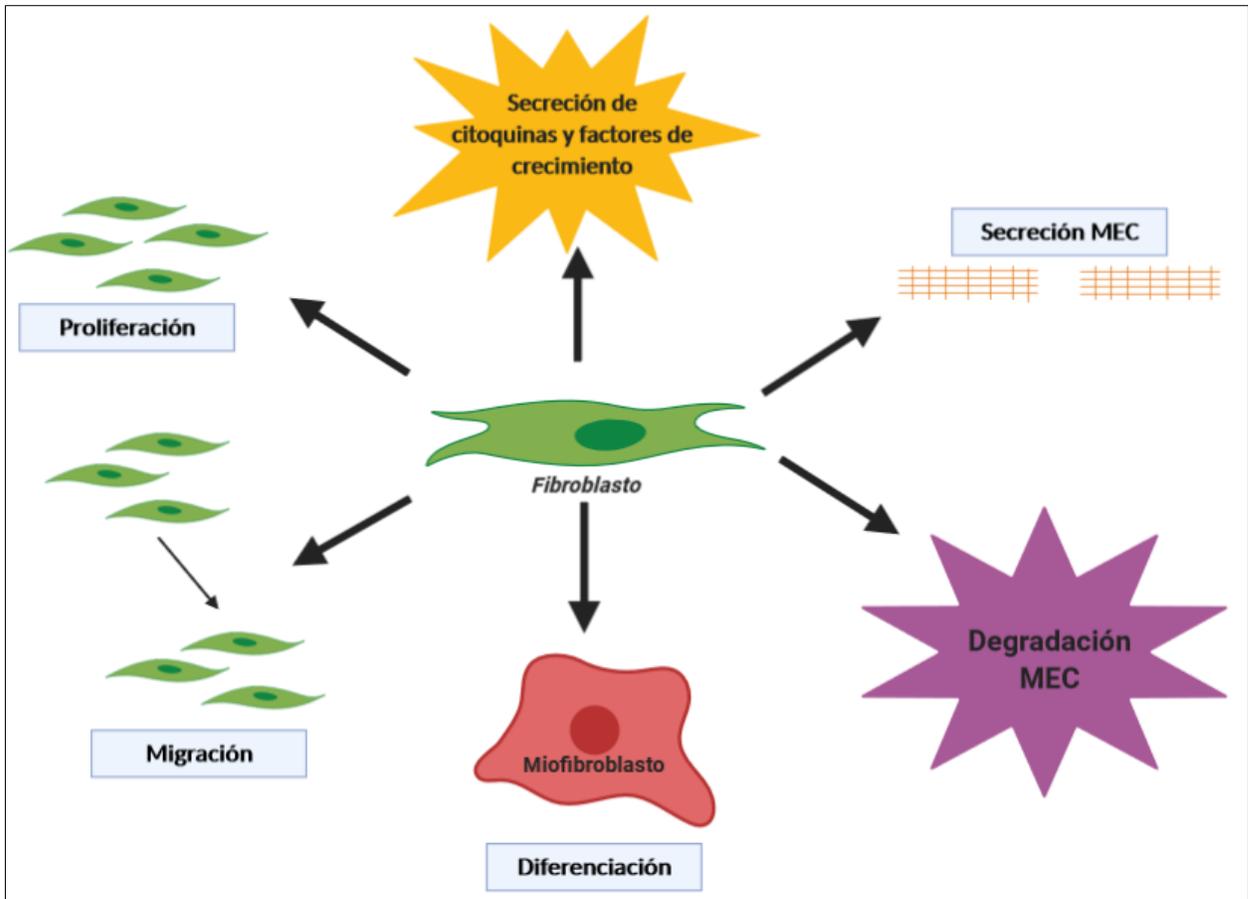
De manera general se define a los FC como células productoras de tejido conectivo, pero de matriz extracelular (MEC) densa, irregular y compuesta de colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas. Estas células además poseen la capacidad de secretar algunos componentes de matriz como periostina, vimentina, fibronectina y colágeno tipo I, III, V y VI [3]. Los FC juegan un rol importante en el remodelado cardíaco, mediante la regulación de propiedades estructurales, bioquímicas, mecánicas y eléctricas del corazón. Se ha descrito la presencia de diferentes clases de receptores, de los cuales los más importantes en la regulación de sus funciones corresponden a los  $\beta$ 2-adrenérgico ( $\beta$ 2-AR), angiotensina II (RAT1) y receptores B1 y B2 (B1R y B2R) de las cininas. Actualmente se sabe que los fibroblastos poseen un rol importante en procesos inflamatorios y por consiguiente en enfermedades cardiovasculares, pues son capaces de secretar una amplia variedad

de citoquinas y quimioquinas, dejando de lado la creencia de que sólo las células del sistema inmune son las encargadas de este proceso [4]. En la Figura 1, se muestran cuáles son las funciones celulares más importantes de los FC, destacando entre ellas la diferenciación a miofibroblasto cardiaco (MFC), un fenotipo celular importante para el proceso de cicatrización.

### **1.3 Miofibroblasto Cardiaco**

El MFC no es un componente normal del tejido cardiaco y aparecen sólo después de una injuria cardiaca, como un infarto, y en corazones que han sido expuestos a una sobrecarga de volumen o presión [5]. Esto ocurre en un proceso de diferenciación en el cual los FC se transforman su fenotipo a MFC, proceso mediado principalmente por TGF- $\beta$ 1 (ver Figura 2). Este fenotipo se caracteriza principalmente por un gran aumento en la síntesis y ensamblaje de  $\alpha$ -SMA dando lugar a las fibras de estrés [6]. Además, los MFC entran en un estado no proliferativo y paralelamente comienzan a secretar una gran cantidad de proteínas del componente extracelular [7, 8].

El MFC es el principal mediador en la cicatrización del tejido cardiaco y se ha visto como la célula predominante en las cicatrices producto de infartos. Es relevante como este fenotipo del FC contribuye en la fibrosis cardiaca producto del daño celular mediante la gran secreción de proteínas de la MEC como colágeno, fibronectina y  $\alpha$ -SMA, éste último el cual se asocia a proteínas de vimentina formando sus características fibras de estrés con el citoesqueleto que presenta el MFC [6]. Además, de las diferencias entre FC y MFC nombradas con anterioridad en el proceso de diferenciación se ha demostrado un aumento en la expresión de los receptores B1 de cininas,  $\beta$ 2-Adrenérgico, AT1 de ANG II, y de manera muy importante el receptor TLR4, entre otros [4]. Lo anterior abre la puerta a la posibilidad de que existan diferencias en los niveles del receptor ALX/FPR2, receptor de Resolvina D1 (RvD1), tras la diferenciación por TGF- $\beta$ 1.



**Figura 1. Funciones celulares de fibroblastos cardíacos.** FC están involucrados en una serie de eventos celulares donde pueden proliferar, migrar, diferenciarse a MFC, degradar y sintetizar MEC, además de secretar citoquinas y factores de crecimiento. (Adaptado de Porter y cols.) [9].

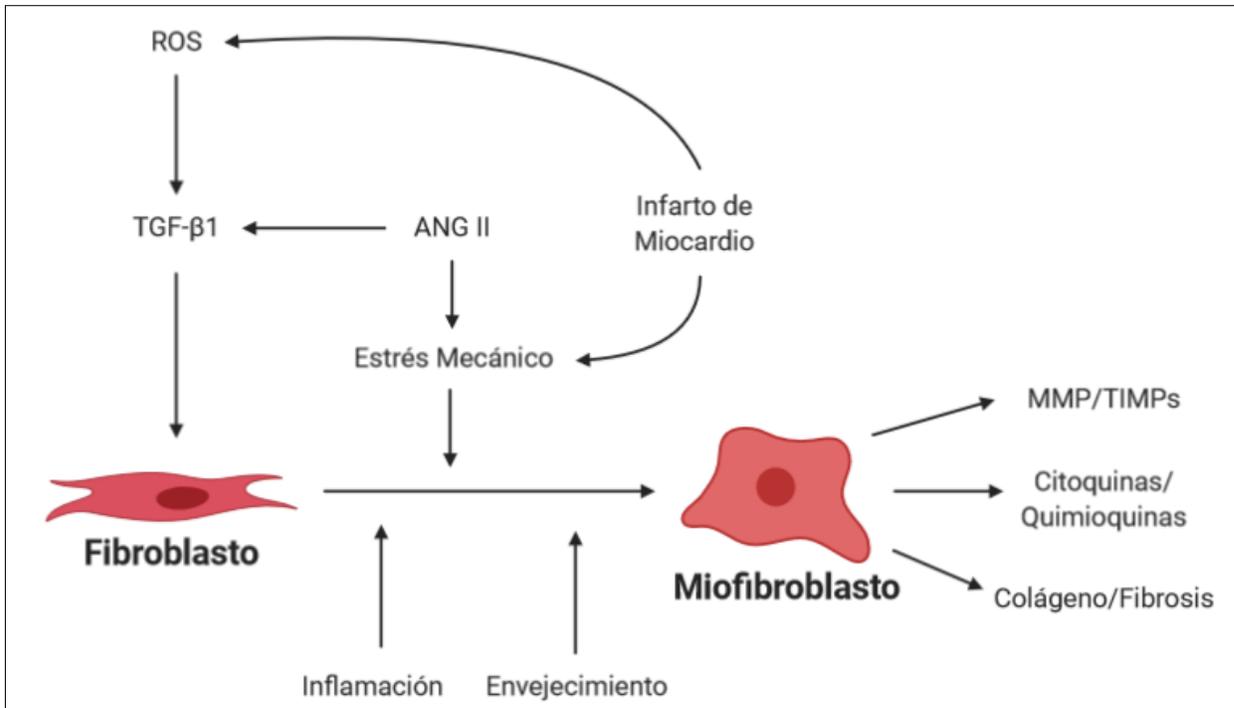
#### 1.4 Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1)

TGF- $\beta$  es una citoquina que contribuye a la función celular a través de la regulación de la inflamación, deposición de matriz extracelular, proliferación celular, diferenciación y crecimiento. Se han identificado tres isoformas TGF- $\beta$  1, 2 y 3, siendo la más común la isoforma 1; las otras dos se encuentran limitadas a células y tejidos específicos. TGF- $\beta$ 1 es una proteína dimérica, la cual se encuentra en un estado inactivo cuando se encuentra unida al péptido asociado a latencia (LAP). Éste péptido se une a la región N-Terminal del TGF- $\beta$ 1 lo que evita la interacción de este último con su receptor. El corte proteolítico de la proteína LAP libera al TGF- $\beta$ 1, permitiendo así su unión a receptores [5]. Los receptores de TGF- $\beta$ 1 (TGFR1 y TGFR2) poseen dos

vías de activación, la canónica y no canónica. En resultados de nuestro laboratorio (presentados por Bolívar et al., 2017) hemos demostrado que los FC, expresan las tres isoformas de TGF- $\beta$ 1, siendo la mayoritaria TGF- $\beta$ 2 [10].

La vía canónica se activa una vez el TGF- $\beta$ 1 se une a TGFR2, el cual recluta y activa a TGFR1, lo que produce que río abajo este último receptor fosforile a las proteínas SMAD2 y SMAD3, las cuales forman un complejo con SMAD4 el cual se transloca al núcleo. El componente SMAD 3 se une directamente a promotores de genes para inducir la transcripción de proteínas profibróticas como  $\alpha$ -SMA, colágeno I, inhibidor de metaloproteinasas de matriz (TIMP) lo que induce la diferenciación de los FC a MFC y el depósito de las proteínas de matriz [11].

La vía no canónica ocurre mediante la activación del receptor de igual forma que en la canónica, por TGF- $\beta$ 1, pero río abajo se desencadena la activación de las vías ERK1/2, concluyendo de igual manera en resultados similares a nivel protéico [12]. En la figura 2, se muestra de forma esquemática los factores que estimulan la diferenciación de FC a MFC y cuáles son las funciones celulares de MFC.



**Figura 2. Resumen de factores que afectan la diferenciación de Fibroblasto a Miofibroblasto.** Así como el estrés mecánico hay otros factores que pueden afectar en la diferenciación como la inflamación del tejido cardiaco o el envejecimiento. Sin embargo, siempre el gran mediador corresponde a TGF-β1 siendo aumentado ante la elevación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como con el incremento de ANG II. Este nuevo fenotipo tiene la capacidad de secretar metaloproteinasas de matriz (MMP) e inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), citoquinas, quimioquinas y colágeno. (Adaptado de Tarbit, Singh, Peart & Rose Meyer, 2019) [5]

#### 1.4.1 Alfa- actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA)

$\alpha$ -SMA corresponde a una isoforma de actina que predomina en el músculo liso vascular y juega un rol importante en la fibrogénesis. Se correlaciona con la presencia de miofibroblastos, los cuales juegan un rol clave en la respuesta fibrótica [13]. Los niveles de esta proteína aumentan en el proceso de cicatrización, lo que genera un aumento en el paso de fibroblastos a miofibroblastos, siendo un muy buen marcador de este proceso [3]. Por otro lado, en un modelo *in vivo* de fibrosis renal provocada por una obstrucción ureteral unilateral (UUO, del inglés *unilateral ureteral obstruction*), se observó en primera instancia un aumento de  $\alpha$ -SMA posterior a la obstrucción, dando cuenta del paso de fibroblastos a miofibroblastos y el comienzo del proceso de fibrosis. Sin embargo, posterior al tratamiento con Resolvina D1 (RvD1), los niveles de dicha proteína disminuyeron, y junto con ello la presencia de miofibroblastos, lo que se tradujo en una inhibición del proceso fibrótico [14]. Esto da cuenta de que RvD1 puede

tener capacidad de modular la expresión de esta proteína; sin embargo, a nivel del FC no hay estudios que indiquen de qué manera respondería la célula al ser activado el receptor ALX/FPR2 por RvD1.

### **1.5 Participación de fibroblastos y miofibroblastos en la secreción de proteínas de matriz extracelular.**

Independiente del tipo de tejido, fibroblastos y miofibroblastos están activamente involucrados en el proceso dinámico de cicatrización. Se ha descrito que FC y MFC tienen una serie de funciones, pudiendo migrar a la herida, proliferar, sintetizar componentes de MEC, formar el tejido de granulación, secretar componentes inflamatorios, degradar MEC y generar fuerzas mecánicas en la herida para comenzar con su contracción (ver Figura 1) [9,15]. En general, la contracción de la herida puede ser benéfica para la reparación de esta, por la reducción del tamaño y de la formación de una cicatriz reparativa mecánicamente fuerte. A pesar de ello, en ciertas circunstancias la presencia y la excesiva actividad de los fibroblastos y miofibroblastos, puede conducir a una mala reparación de la herida, generando fibrosis y una contracción defectuosa de la cicatriz [16]. Por lo que es importante continuar estudiando los mecanismos moleculares involucrados que ocurren en FC y MFC.

#### **1.5.1 Colágeno**

El colágeno es una proteína de la matriz extracelular, el cual tiene funciones de tipo estructural en los tejidos, y posee una gran cantidad de isoformas, los cuales se distribuyen en diferentes tejidos del cuerpo. A nivel del FC podemos encontrar que este tipo celular sintetiza y secreta los colágenos tipos I, III, IV, V y VI, siendo su principal función mantener la integridad de la matriz extracelular [3,17]. Sin embargo, su síntesis puede verse modulada por diferentes estímulos, como, por ejemplo, TGF- $\beta$  o angiotensina II (ANG II), los cuáles aumentan la síntesis y secreción de colágeno, pero también se observa una disminución en la síntesis y secreción de colágeno si la célula es estimulada con bradicinina, prostaciclina u óxido nítrico (NO) [18]. En este sentido, se suele asociar el aumento de colágeno con un daño celular, y la entrada a un proceso fibrótico.

## **1.6 Vías de señalización que participan en la síntesis y secreción de colágeno**

Las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/AKT son vías que se encuentran ampliamente estudiadas y participan en una gran cantidad de procesos a nivel celular como diferenciación, supervivencia, proliferación, movimiento celular, quimiotaxis, etc. [19,20]. La activación de ERK1/2 ocurre cuando la proteína Ras es activada en respuesta al estímulo de algún agonista, ésta recluta a la proteína Raf, la cual fosforila y activa a MEK, la que fosforila a ambas proteínas ERK1 y ERK2 [21].

Por otro lado, la activación de PI3K/AKT ocurre cuando la proteína PI3K es reclutada por proteínas adaptadoras de la membrana plasmática cuando llega algún estímulo, ésta se encarga de fosforilar PIP2 para generar PIP3, el cual es un segundo mensajero que activa finalmente a la proteína AKT, fosforilándola [22].

En el tejido epidermal existe una gran cantidad de evidencia que muestra de manera directa que la síntesis de colágeno está mediada por la activación de las vías ERK1/2 y PI3K/AKT [23-25]. Por otro lado, en células pancreáticas estrelladas se ha demostrado un aumento en la síntesis de colágeno mediado por fibrinógeno a través de las vías ERK1/2 y PI3K/AKT [26]. También se ha visto activación de estas vías de señalización en células madre mesenquimales [27]. A nivel de FC solo se tienen antecedentes de que la activación de AT1-R por ANG II y  $\beta$ 2-AR genera la activación de la vía ERK1/2; sin embargo, no se tienen antecedentes relacionados entre RvD1 y las vías mencionadas.

## **1.7 Resolvina D1 (RvD1)**

Los lípidos especializados proresolutivos (SMP por su sigla en inglés), se dividen en 4 grandes grupos: Lipoxinas (LX), Resolvinas (Rv), Protectinas (PD) y Maresinas (MaR), cada uno con capacidad de gatillar la resolución de la inflamación tisular, activando distintos receptores encargados de realizar este proceso. El subgrupo de las resolvinas se divide en E y D, dependiendo de su precursor de origen: Ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), ambos ácidos grasos esenciales de omega 3 [28]. Para RvD1 se ha descrito en modelos *in vivo* e *in vitro* efectos como inhibición de migración de neutrófilos, bloqueo de producción de

mediadores proinflamatorios y reducción en la expresión de citoquinas [29-31]. Además, para nuestro interés se ha descrito que este mediador es capaz de modular los niveles de expresión de proteínas de la MEC como el colágeno [14,32].

Se ha descrito que las acciones de la RvD1 son mediadas por su interacción con el receptor para LXA4, ALX/FPR2 [33], y el receptor huérfano GPR32 en humanos [34], ambos receptores acoplados a proteína G. Sin embargo, sus vías de señalización han sido poco estudiadas, y varían dependiendo del tipo celular. En cultivos de células de la conjuntiva de córnea de rata se han descrito acciones mediante la activación de la PLA<sub>2</sub>, PLD, PLC y la consiguiente activación de PKC con aumento de calcio intracelular [35]. Por otra parte, y respecto de las vías de señalización intracelular, se ha observado que la activación del receptor ALX/FPR2, mediante RvD1 puede inhibir las vías ERK1/2, PI3K/AKT y NF- $\kappa$ B, en fibroblastos de pulmón inducidas por LPS [18,36]. Además, se ha descrito que RvD1 en un modelo *in vivo* de infarto en ratas adultas fue capaz de reducir el tamaño del infarto mediante la vía PI3K/AKT [37] Sin embargo no existe evidencia de las vías de señalización mediadas por RvD1 en FC ni en MFC a través de su receptor ALX/FPR2.

### **1.8 Receptor ALX/FPR2**

Corresponde a un receptor acoplado a Proteína G que se expresa en varios tejidos, como corazón, pulmón, riñón, intestino, entre otros [31]; presentando diferentes funciones, dependiendo del tejido en el cual se presenta [34]. Este receptor, posee como ligando proteínas, lípidos y péptidos, lo que da cuenta de su nombre (LXA4 Receptor/Formyl Peptide Receptor 2) [38]. En humanos se han descrito dos GPCRs, GRP32 y ALX/FPR2 [39], y se encuentran altamente expresado en monocitos, células T y macrófagos, además de varios tipos celulares residentes como fibroblastos sinoviales y células del epitelio intestinal [40,41]. En macrófagos, la activación de ALX/FPR2 por RvD1 disminuye drásticamente los niveles de Ca<sup>+2</sup>, además de disminuir la activación de la Calcio-Calmodulina Quinasa II (CaMKII) [42]. Se ha encontrado además que se expresa en fibroblastos, en donde su ligando principal LXA4, regula la migración de fibroblastos e inhibe la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1. Además, se sabe que puede ser activado también por RvD1 [43], y que en

fibroblastos 3T3 de ratón puede tener un aumento en su expresión estimulada por TGF- $\beta$ 1 [44] y se ha evidenciado un aumento en la expresión de mRNA del receptor al tratar con LPS a macrófagos [45].

### **1.9 Participación de RvD1 y ALX/FPR2 en la expresión de colágeno**

La participación y relación entre RvD1 y la síntesis y secreción de colágeno no ha sido muy estudiada; sin embargo, existe evidencia que establece que este SMP es capaz de modular niveles de esta proteína. En células alveolares tipo dos de pulmón se ha observado que RvD1 posee efectos reparativos, tales como proliferación, reducción de apoptosis, y la inhibición de la transición epitelio mesénquima inducida por TGF- $\beta$ 1 hecho que ocurre ante un proceso fibrótico. En ese mismo trabajo además se estudiaron los efectos de RvD1 en fibroblastos de pulmón, en donde demostró que redujo la proliferación, la diferenciación a miofibroblasto y mayormente de nuestro interés, también redujo la producción de colágeno [44]. Además, en dos estudios similares de modelos de obstrucción ureteral unilateral en ratones concluían que RvD1 disminuyó todos los síntomas de la fibrosis producida por esta obstrucción, demostrado tras la utilización de varios marcadores; entre ellos  $\alpha$ -SMA y colágeno I. Los autores demostraron que RvD1 disminuía los niveles de ambas proteínas mencionadas, evitando así el daño crónico [14, 46]. En contraposición a la literatura que relaciona solo RvD1 y colágeno nos encontramos con la activación del receptor ALX/FPR2 por otros de sus ligandos, como por ejemplo la LXA<sub>4</sub>. Se ha encontrado que la activación de este receptor muestra un aumento de colágeno y disminución en la infiltración de neutrófilos en un modelo de dilatación aortica inducida por ANG-II en ratones [47]. Del mismo modo, en un modelo de lesiones ateroscleróticas en carótidas humanas se demostró que la presencia del receptor FPR2 genera un aumento los niveles de mRNA de Colágeno I, mostrando disminuciones significativas ante aquellos que no presentaban el receptor. Por otro lado, en un modelo *in vivo* de úlceras de piel en ratas adultas wistar se demostró que la administración de LXA<sub>4</sub> microencapsulada, aumentó de manera significativa la deposición de colágeno en la piel, esto mediante el receptor ALX/FPR2, puesto que en presencia del antagonista del mismo no se observó el aumento de colágeno visto con la lipoxina sola.

Finalmente, dada las características de los FC y los MFC como principales productores de colágenos en el tejido cardíaco y responsables del proceso de cicatrización, así como también de la fibrosis cardíaca, se hace necesario evaluar si la RvD1 puede ejercer algún efecto modulador respecto de la síntesis de colágeno, ya sea con la finalidad de favorecer el término de la inflamación y con ello la cicatrización; o por el contrario, favorecer una respuesta fibrótica o antifibrótica, dado que los MFC solo están presentes en el tejido dañado. Más aun, y debido a que después del proceso inflamatorio viene el proceso de cicatrización, y en ambos procesos participan estos tipos celulares, cabe la duda responder cual será el efecto de la RvD1 en ambos tipos celulares en cuanto a la síntesis de colágeno. En conclusión, a nivel de FC o MFC no existe ningún tipo de evidencia que entregue una directa relación entre RvD1, el receptor ALX/FPR2 y la secreción o síntesis de colágeno.

Por consiguiente, los antecedentes previamente mostrados nos permiten formular la siguiente hipótesis:

## **2.- HIPÓTESIS**

En miofibroblastos cardiacos, diferenciados desde fibroblastos cardiacos de rata adulta por TGF- $\beta$ 1, RvD1 activa el receptor ALX/FPR2 y a través de las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/AKT promueve la síntesis de colágeno I.

## **3.- OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si en miofibroblastos cardiacos, diferenciados desde fibroblastos cardiacos de rata adulta, RvD1 a través de la vía transduccional ALX/FPR2 (ERK1/2 y/o PI3K/AKT), aumenta la síntesis de colágeno.

## **4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**4.1** Estudiar si los agonistas proinflamatorios o profibróticos (LPS, TGF- $\beta$ 1, ANG II y RvD1), inducen la expresión del receptor ALX/FPR2 en FC.

**4.2** Evaluar si en FC y MFC de rata adulta la RvD1 activa el receptor ALX/FPR2 y las vías transduccionales ERK1/2 y PI3K/AKT.

**4.3** Evaluar si en FC y MFC la RvD1 a través de ALX/FPR2 y las vías ERK1/2 y PI3K/AKT induce la expresión de colágeno.

## **5.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Reactivos**

Suero fetal bovino (FBS), tripsina/EDTA, medio de cultivo DMEM/F12 y compuestos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany). Estándar de peso molecular fueron adquiridos en MaestroGen (Hsinchu City, Taiwán). Reactivos para quimioluminiscencia mejorada (ECL) fueron comprados en PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Material de plástico estéril fue obtenido en Corning Inc. (New York, NY). Anticuerpos primario anti COL1A1,  $\alpha$ -SMA, p-p44/42, p-AKT, p44/42, AKT y anticuerpo secundario Horse anti-mouse IgG-HRP fueron adquiridos a Cell Signaling Technology Inc. (MA, EEUU). Anticuerpos primario anti ALX/FPR2 y anti-GAPDH fueron adquiridos a Santa Cruz Biotechnology (LO, RU). Reactivo TGF- $\beta$ 1 y Anticuerpo secundario Goat Anti-rabbit IgG-HRP fue adquirido en R&D Systems, Inc. (MN, EEUU). WRW4 fue adquirido a TOCRIS bioscience (MN, EEUU). PD98059 y Bradford Reagent fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). LY294002 y RvD1 (CAS 872993-05-0) fueron comprados a Cayman Chemical Company (MI, EEUU). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue (CAS 15250-061) fueron comprados a Life Technologies Corporation (CA, EEUU).

### **5.2 Modelo animal**

Ratas Sprague-Dawley adultas de 6-8 semanas de edad fueron obtenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron en jaulas (con ciclos de luz/oscuridad de 12 h) y libre acceso a alimento y agua. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de la NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en el 2011 [48], y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad.

### **5.3 Aislamiento de fibroblastos cardíacos**

FC fueron aislados de ratas macho Sprague-Dawley usando digestión enzimática. Las ratas fueron anestesiadas con una inyección de ketamina/xilazina (2:1) y los corazones extraídos en un ambiente aséptico. Se removieron las aurículas y los ventrículos fueron cortados en trozos pequeños (1-2 mm) para luego ser sometidos a incubación con colagenasa tipo II. El producto de la digestión fue separado mediante centrifugación a 1000 RPM por 10 min. El pellet fue resuspendido en 10 ml de DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS y antibióticos (estreptomocina 100 µg/ml, penicilina 100 UI/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml) y cultivados en una atmósfera con 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub> y 37°C hasta confluencia (6-7 días).

### **5.4 Pasaje celular**

Para la realización de los experimentos, los FC se mantuvieron en medio DMEM-F12/FBS 10% hasta confluencia en pasaje 0. Posteriormente, se lavaron las placas con PBS 1X y las células se soltaron con tripsina/EDTA 0,05% en PBS 1X estéril, las cuales fueron contadas por el método de exclusión de Azul de Tripán. Luego, se sembraron 250.000 células/placa en placas de cultivo de 60mm. Transcurridas 24 horas desde el pasaje, los fibroblastos fueron lavados con PBS 1X estéril, se privaron de suero con medio DMEM-F12 por 24 horas y se les cambió medio a DMEM-F12/FBS 1% en el cual se realizaron los diferentes ensayos.

### **5.5 Diferenciación de FC a MFC**

Para los experimentos realizados en MFC se trataron los FC con TGF-β1 en una concentración de 10 ng/mL, el cual fue agregado a las placas una vez concluido el procedimiento previo de pasaje celular. Estas placas se mantuvieron durante 72 horas con esta citoquina, se realizaron dos lavados con PBS 1X estéril y se añadió nuevamente medio DMEM F12/FBS 1%. Luego se realizaron los diferentes ensayos (ver Figura 3).

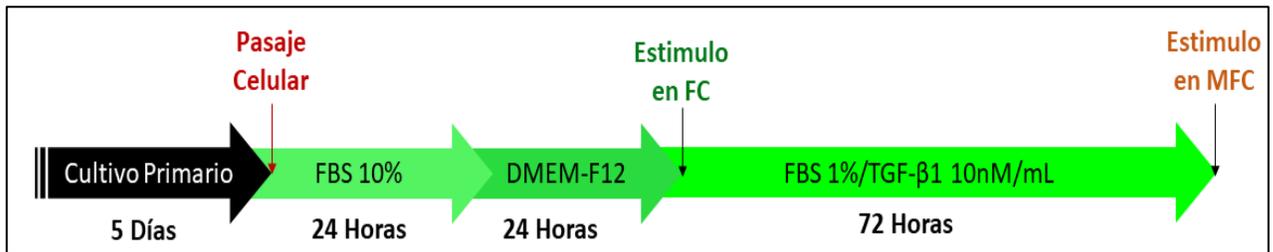


Figura 3. Procedimiento experimental de tiempos de plaqueo y estímulos en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos.

## 5.6 Western Blot

Las muestras fueron recolectadas de las placas de cultivo de 60 mm, previamente lavadas con PBS 1X no estéril frío (1 mL x 2). Luego, se adicionaron 60  $\mu$ L de Tampón de Lisis y se procedió a la obtención del lisado celular raspando suavemente la placa. La muestra fue recolectada en tubos Eppendorf de 1,5 mL, se *sonicó* por 5 minutos y luego se centrifugó a 15.000 rpm por 10 minutos. Se descartó el pellet y 5  $\mu$ L del remanente fueron utilizados para cuantificar la concentración de proteína de la muestra empleando el Método de Bradford. Posteriormente, se adicionó 16,6  $\mu$ L de Tampón de Carga 4X y se calentó durante 5 minutos a 100° C para denaturar las proteínas.

La separación de las proteínas por su masa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución de acrilamida/bis-acrilamida. La concentración del gel concentrador (*stacking*) fue 5%, mientras que la del gel separador (*running*) fue de 12%. Se adicionaron volúmenes equivalentes a 25  $\mu$ g de proteína por carril. La electroforesis se realizó a 70 V por 30 minutos para concentrar la muestra, y luego a 100 V para la separación, en tampón de electroforesis.

Luego de realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ M de poro durante 90 minutos a una corriente constante de 0,35 A en tampón de transferencia. Una vez transferidas las proteínas a las membranas, se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con leche descremada al 5% (p/v) y posteriormente, se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios ( $\alpha$ -SMA 1:10000, COL1A1 1:2000, ALX/FPR2 1:1000, p-p44/42 1:2000, p-AKT 1:2000, p44/42 1:2000, AKT 1:2000,

GAPDH 1:2000) durante toda la noche a 4°C. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron durante 15 min en TBS 1X/ Tween-20 al 0,1%, y fueron incubadas durante 120 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-*rabbit* (dilución 1:5000) y anti-mouse (dilución 1:5000), según correspondiera, en TBS 1X/Tween-20 al 0,1%.

Para la inmunodetección, las membranas previamente lavadas fueron incubadas por 3 minutos con el reactivo quimioluminiscente ECL y la quimioluminiscencia fue detectada por el equipo C-DiGit (LI-COR Biosciences, Nebraska), mediante el software computacional Image Studio (LI-COR Biosciences, Nebraska). Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante la herramienta de cuantificación del software Image Studio y normalizados respecto a GAPDH, siendo los resultados expresados como veces sobre el control.

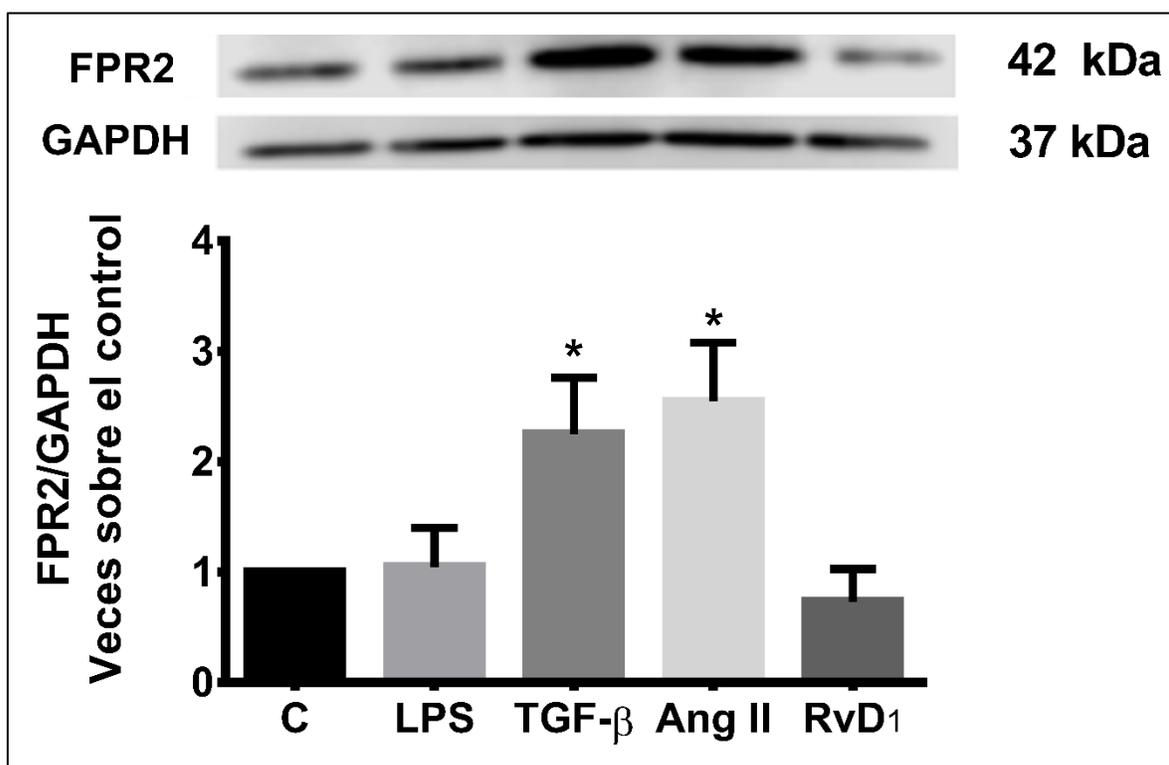
### **5.7 Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SD, de al menos tres experimentos independientes ( $n \geq 3$ ). Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA de una vía y luego mediante Test de Tukey, lo que permitió determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose significativa la diferencia entre dos grupos cuando su valor de  $p < 0,05$ .

## 6.-RESULTADOS

### 6.1 Expresión del receptor ALX/FPR2 en FC

Resultados previos del laboratorio ya habían demostrado la presencia del receptor ALX/FPR2 (receptor de RvD1) en FC; sin embargo, no se tenía conocimiento de qué ocurría con este receptor, ante la presencia de diferentes estímulos para la célula. En este sentido, es bien sabido que otros tipos de receptores como B1R o  $\beta$ 2-AR aumentan sus niveles ante un estímulo como TGF- $\beta$ . Por lo que se realizó un ensayo, donde se determinó qué sucedía con ALX/FPR2 ante estímulos como RvD1, LPS, ANG II y TGF- $\beta$ , todos durante 24 horas. Los resultados muestran que hubo un claro aumento en los niveles de expresión de ALX/FPR2 con ANG II y TGF- $\beta$  respecto de la condición control; mientras que LPS y RvD1 no fueron capaces de aumentar la expresión de ALX/FPR2 (Figura 4).

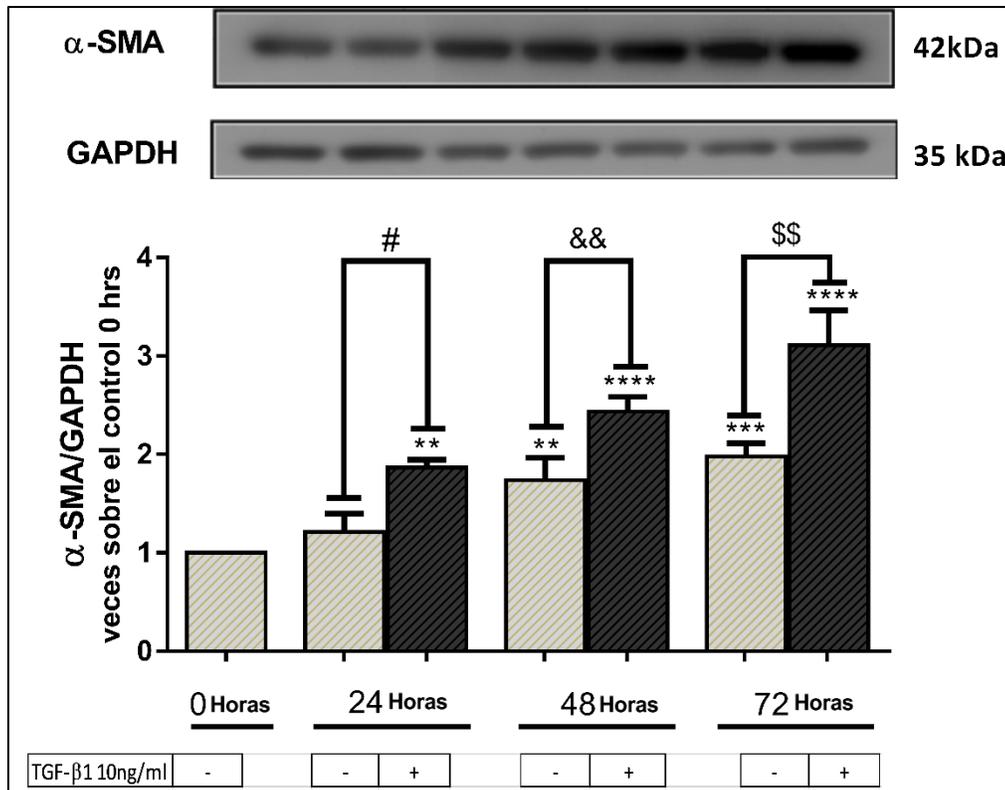


**Figura 4. Niveles de expresión del receptor ALX/FPR2 ante estímulos LPS, TGF- $\beta$ , ANG II y RvD1.** Los FC de trataron durante 24h con LPS 1 $\mu$ g/mL, TGF- $\beta$ 1 10ng/mL, ANG II 1 $\mu$ M y RvD1 100nM. Y se determinaron los niveles de expresión del receptor ALX/FPR2 mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \* $p$ <0,05 vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SD. (n=3).

## 6.2 Diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos por TGF- $\beta$

Tanto ANG II como TGF- $\beta$  que lograron aumentar significativamente los niveles del receptor ALX/FPR2, son capaces de inducir la diferenciación de FC a MFC. Por lo tanto, siendo TGF- $\beta$  del que se posee mayor evidencia y se ha descrito que ante estímulos directos de esta citoquina se logra un alto grado de diferenciación a las 72 horas, mayor que con ANG II; por lo que se estudió si TGF- $\beta$  era capaz de diferenciar los FC a MFC, siendo el mejor marcador de este proceso los niveles de  $\alpha$ -SMA.

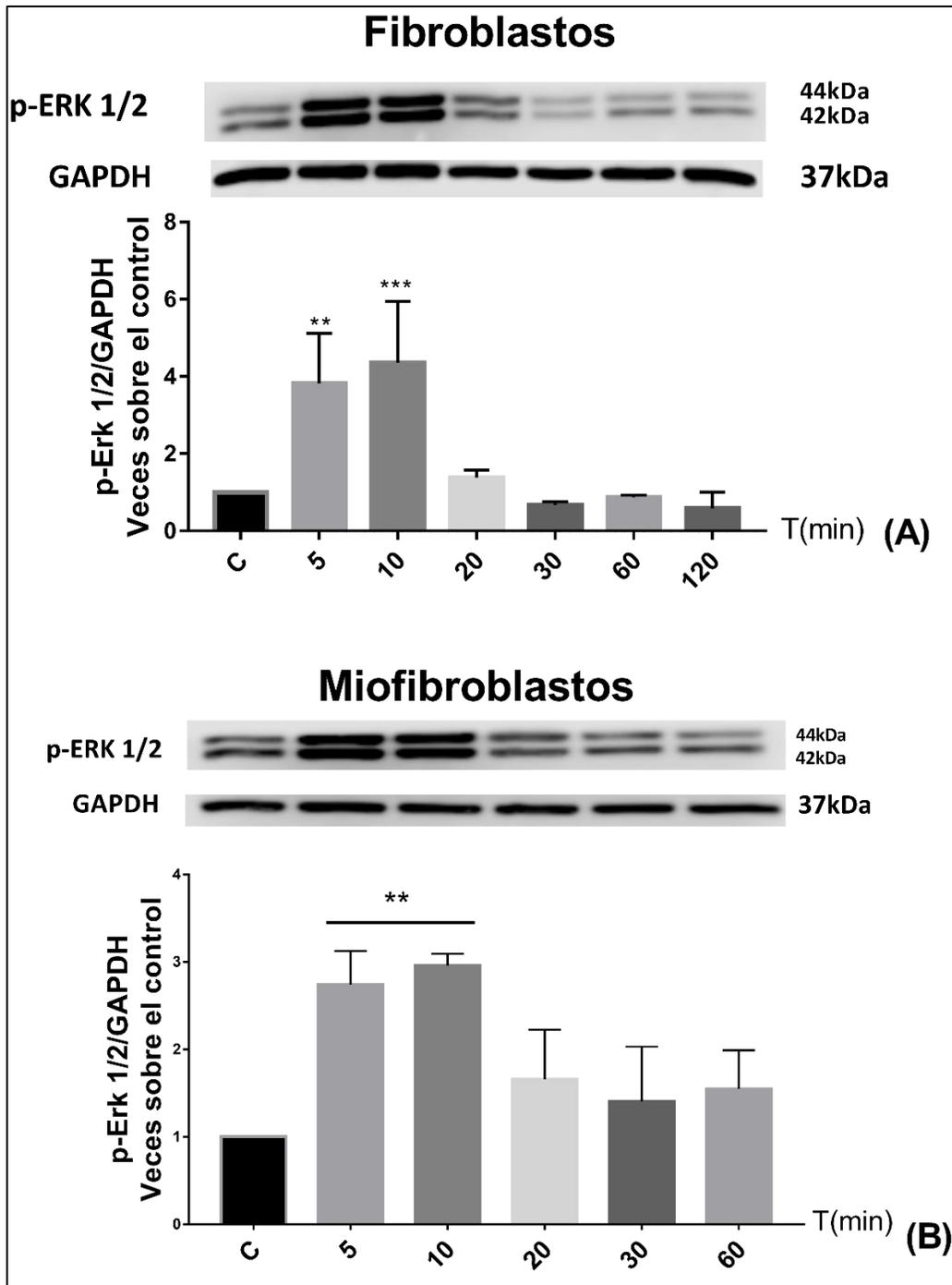
Los resultados muestran que la citoquina en cuestión aumentó de manera estadísticamente significativa los niveles de  $\alpha$ -SMA en función del tiempo, es decir desde las 24 hasta las 72 horas siendo obviamente mayor a tiempos más largos, y dando cuenta de que es capaz de diferenciar los FC a MFC. Sin embargo, se encontró que los niveles de  $\alpha$ -SMA también aumentaron por sí solos al estar en placas de cultivo, siendo significativas a las 72 horas desde el pasaje, pero en menor medida que aquellas estimuladas con TGF- $\beta$  (Figura 5).



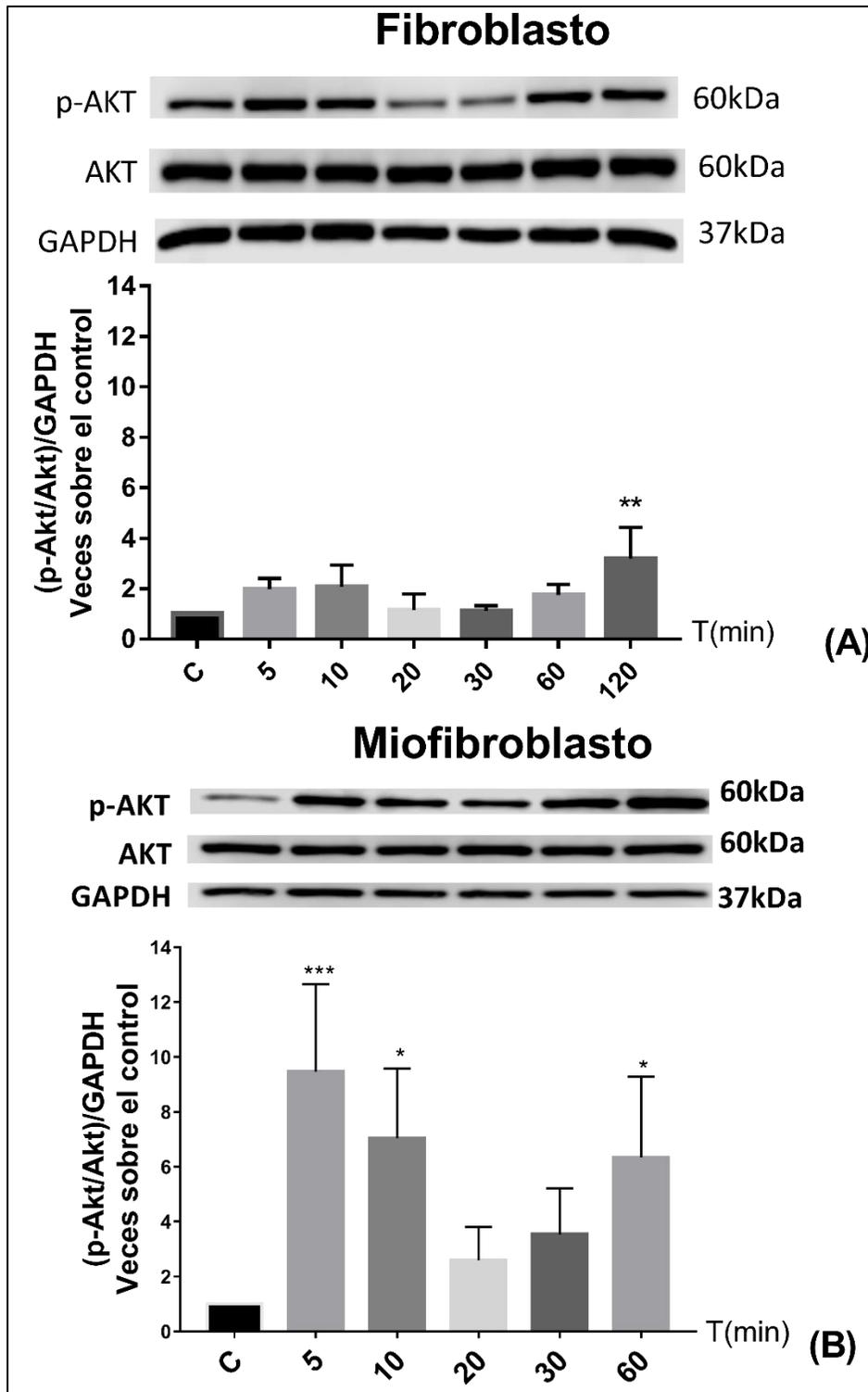
**Figura 5. Efecto de TGF β 1 sobre los niveles de α-SMA en FC.** Los FC se trataron durante 24, 48 y 72 horas con TGF- 10ng/mL en medio F12/FBS 1%, y se midió α-SMA mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \*p<0,05 vs control. \*\*p< 0,01 vs control 0 h \*\*\*p<0,001 vs control 0 h \*\*\*\*p<0,0001 vs control 0 h #p<0,05 vs control 24 H &&p<0,01 vs Control 48 h \$\$\$p<0,01 vs control 72h. Los resultados se expresan como promedio ± SD. (n=5)

### 6.3 Vías de señalización activadas por RvD1 en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos

Ante la poca evidencia que existe sobre las vías transduccionales que son mediadas por RvD1 en el FC y ante la nueva evidencia sobre el aumento del receptor en los MFC se decidió estudiar las vías de señalización intracelular activadas por RvD1 (100 nM). Los resultados mostraron una clara y temprana activación de la vía ERK1/2, evidenciada por la fosforilación de dicha proteína a los 5 y 10 minutos tanto en FC como en el MFC (Figura 6), mientras que a tiempos mayores la fosforilación volvió a niveles similares al control en ambos fenotipos. Esto en contraposición a lo ocurrido con la vía PI3K/AKT, la cual no mostró una activación clara en el FC, pero sí en el MFC, en donde se alcanzó el máximo de fosforilación a los 5 minutos (Figura 7).



**Figura 6. Activación de vía ERK1/2 en FC y MFC.** Se estimularon FC (A) y MFC (B) con RvD1 100nM y se midió la activación de la vía ERK1/2 al observar la fosforilación de dichas proteínas. Se midió p-ERK1/2 mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \*\* $p < 0,01$  vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SD. (n=5)



**Figura 7. Activación diferenciada de vía PI3K/AKT en FC y MFC.** Se estimularon FC (A) y MFC (B) con RvD1 100nM y se midió la activación de la vía PI3K/AKT al observar la fosforilación de AKT. Se midió p-AKT mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \*\*p<0,01 vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SD. (n=5)

#### 6.4 Efecto de RvD1 sobre la síntesis de colágeno en FC.

Al encontrar que RvD1 era capaz de activar vías de señalización que están implicadas en una de las funciones más importantes de los fibroblastos, esto es, la secreción de proteínas de la matriz extracelular, se decidió estudiar si la RvD1, por si misma, lograría tener algún efecto en los niveles de expresión de colágeno en FC, estimulando durante 24, 48 y 72 horas con este mediador proresolutivo.

Los resultados mostraron que en FC la RvD1 no aumentó la expresión de colágeno. Sin embargo, y de igual manera que  $\alpha$ -SMA, esta proteína de matriz aumenta por si sola con el tiempo de cultivo. Por otro lado, se observa una tendencia al aumento con RvD1, siendo más evidente a las 72 horas, donde se logra un aumento al doble para el control y un aumento de 2,5 veces con el estímulo de ese mismo tiempo respecto del control 24 horas, aunque este resultado no fue estadísticamente diferentes respecto de la condición control a las 72 horas con las células estimuladas con RvD1 a ese mismo tiempo (Figura 8).

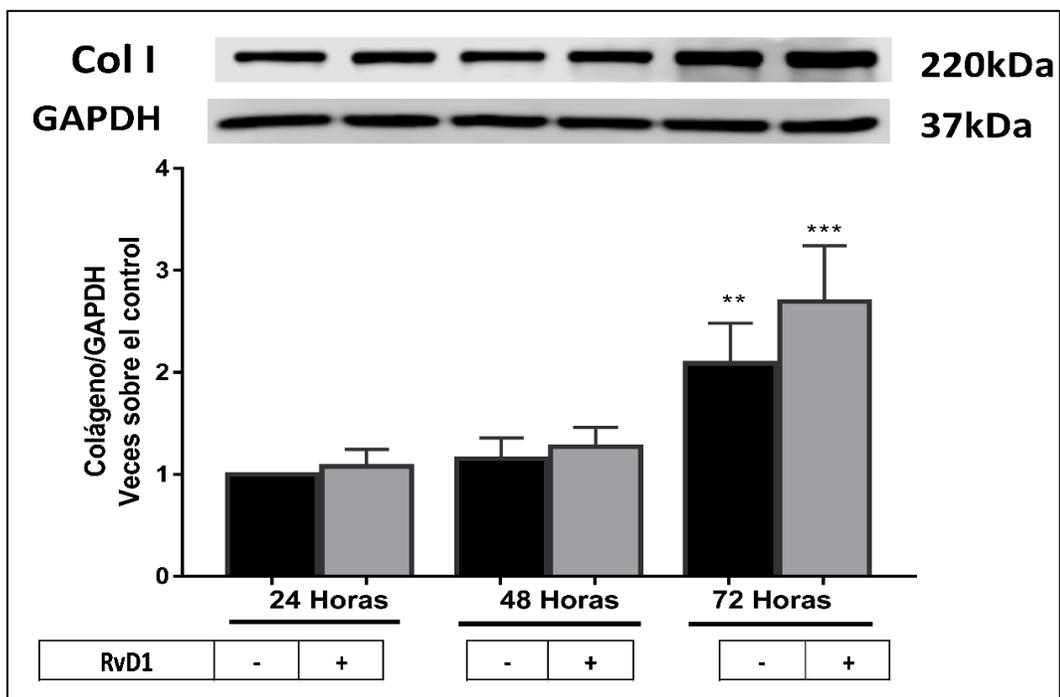
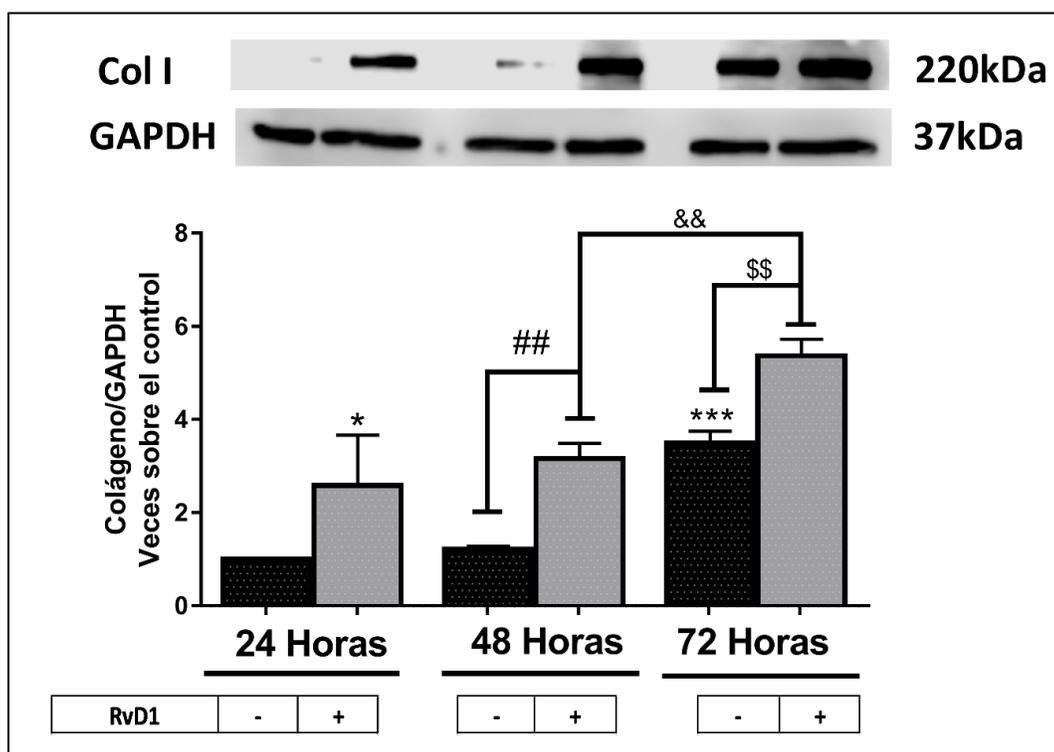


Figura 8. Efecto del tiempo y de RvD1 en los niveles de expresión de colágeno I. Se estimularon FC con RvD1 100nM y se mantuvieron por 24, 48 y 72 horas en F12/FBS 1%. Se midió colágeno mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \*\*p< 0,01 vs control 24H \*\*\*p<0,001 vs control 24H. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SD. (n=4)

## 6.5 Efecto de RvD1 sobre la síntesis de colágeno I en MFC.

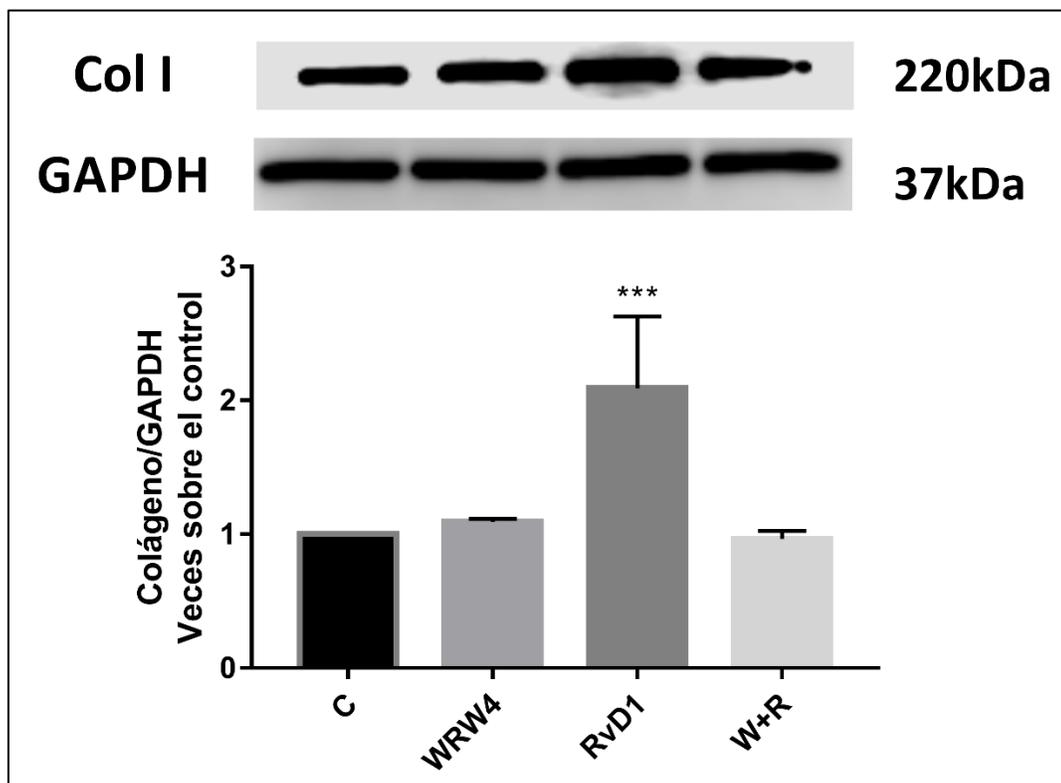
Dado el resultado previamente descrito, el cual mostraba que los niveles del receptor ALX/FPR2 se encontraban aumentados al estimular con TGF- $\beta$ 1 (Figura 4), se estudió si en el MFC, RvD1 tendría influencia en los niveles de colágeno I, dado el aumento del receptor y considerando además que el MFC es un fenotipo que se encarga de secretar una cantidad mayor de proteínas de matriz.

Los resultados mostraron que RvD1 tiene la capacidad de incrementar de manera tiempo-dependiente los niveles de colágeno I (Figura 9). En este caso a todas las horas estudiadas se lograron aumentos significativos con respecto a sus propios controles, incrementando con RvD1 a las 24 horas 2,5 veces; a las 48 horas 3,2 veces; y a las 72 horas un aumento de 5,4 veces respecto al control. Además, se evidencia nuevamente que con el paso del tiempo los niveles de colágeno aumentan, llegando a verse un aumento de 3,5 veces respecto al control



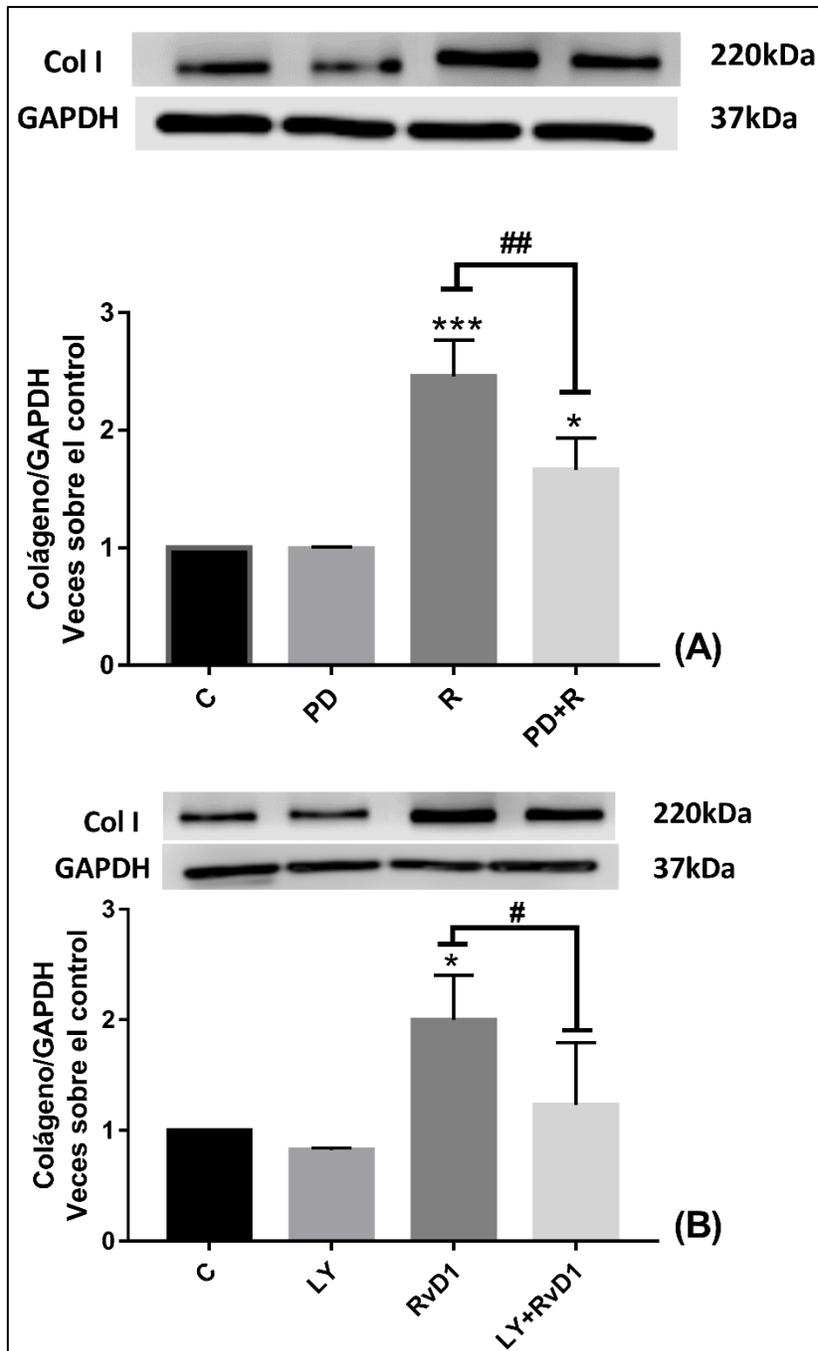
**Figura 9. Expresión de colágeno ante estímulo con RvD1 por 24, 48 y 72 horas.** Se estimularon MFC con RvD1 100nM y se mantuvieron por 24, 48 y 72 horas en F12/FBS 1%. Se midió colágeno mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \* $p < 0,05$  vs control 24H \*\*\* $p < 0,001$  vs control 24H ## $p < 0,01$  vs control 48 horas &&  $p < 0,01$  vs control 72 horas \$\$  $p < 0,01$  vs RvD1 48 horas. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SD. (n=5)

Para comprobar que estos efectos mediados por RvD1 resultaban por participación de su receptor ALX/FPR2, se trataron durante 48 horas MFC con RvD1 en condiciones con inhibidor y sin inhibidor de dicho receptor, WRW4. Los resultados comprobaron que la respuesta era completamente mediada por el receptor, dado que en presencia del inhibidor se anuló completamente la expresión de colágeno estimulada por RvD1 (Figura 10).



**Figura 10. Inhibición de la expresión de colágeno estimulado por RvD1 con WRW4.** Se trataron MFC con RvD1 100nM por 48 Horas en medio F12/FBS 1% en presencia (W+R) y ausencia (RvD1) del inhibidor del receptor ALX/FPR2, WRW4, así como en condiciones solo con el inhibidor (WRW4) y como control se utilizaron MFC sin tratar. El inhibidor se agregó media hora antes que RvD1. Se midió colágeno mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \*\*\* $p < 0,001$  vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SD. (n=4).

Además, al saber que las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/AKT eran activadas por RvD1, se dio a paso a evaluar si estas vías de señalización están implicadas en la expresión de colágeno. Con esta finalidad, se realizó un ensayo en el que se estimularon MFC con RvD1 (100 nM) en presencia y ausencia de los inhibidores de las vías ERK1/2, PD98058 y PI3K/AKT, LY294002. Los resultados indicaron que ambas vías se encuentran implicadas en la expresión de colágeno estimulada por RvD1. Al inhibir la vía ERK1/2 previo a estimular con RvD1 se disminuyó la expresión de colágeno, pero no de manera completa. Igual situación ocurre cuando se inhibe la vía PI3K/AKT; sin embargo, en ningún caso se evidencia una anulación total del efecto de RvD1, como lo evidenciado con WRW4, inhibidor del receptor ALX/FPR2 (Figura 11).



**Figura 11. Inhibición parcial de la expresión de colágeno estimulado por RvD1 con PD98059 y LY294002.** Se trataron MFC con RvD1 100nM por 48 horas en medio F12/FBS 1% en presencia (PD +R) y ausencia (RvD1) del inhibidor de la vía ERK1/2 así como en condición solo con inhibidor (PD) (A). Se trataron MFC con RvD1 100nM en medio F12/FBS 1% en presencia (LY+R) y ausencia (RvD1) del inhibidor de la vía PI3K/AKT así como en condición solo con inhibidor (LY) (B). Como control se utilizaron MFC sin tratar. Los inhibidores se agregaron media hora antes que RvD1. Se midió colágeno mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \* $p < 0,05$  vs control \*\*\* $p < 0,001$  vs control # $p < 0,05$  vs LY+R ## $p < 0,01$  vs PD+R. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SD. (n=3)

## 6.6 Efecto de RvD1 en la expresión de colágeno en MFC autoinducidos.

Por otro lado, y como se vio anteriormente, en ausencia de estímulos profibróticos, tanto  $\alpha$ -SMA como colágeno I aumentaron en forma dependiente del tiempo de plaqueo de los FC en la placa de cultivo, lo que nos habla de un proceso de diferenciación de FC a MFC autoinducido (MFC-AI). Por lo anterior, es que se decidió estudiar y comparar si existía una respuesta diferente en los niveles de expresión de colágeno I, entre los MFC autoinducidos versus aquellos FC tratados con TGF- $\beta$ 1 los cuales se denominarán MFC Inducidos (MFC-I) con tal de inferir, además, de manera indirecta si esta diferenciación autoinducida también podría estar generando un aumento del receptor ALX/FPR2. Para esto se establecieron 4 grupos experimentales, los cuales fueron FC que se mantuvieron en medio con FBS 1% en presencia (MFC-I) y ausencia (MFC-AI) de TGF- $\beta$ 1, tratándolos posteriormente por 48 Horas con RvD1. Se estableció como controles MFC-AI y MFC-I sin tratamiento con RvD1. En todos los grupos el tiempo de plaqueo fue el mismo. (Figura 12)

Los resultados evidenciaron que, en los MFC autoinducidos, la RvD1 fue capaz de generar un aumento en los niveles de colágeno similares a aquellos observados en los MFC generados previamente con TGF- $\beta$ 1 (Figura 13).

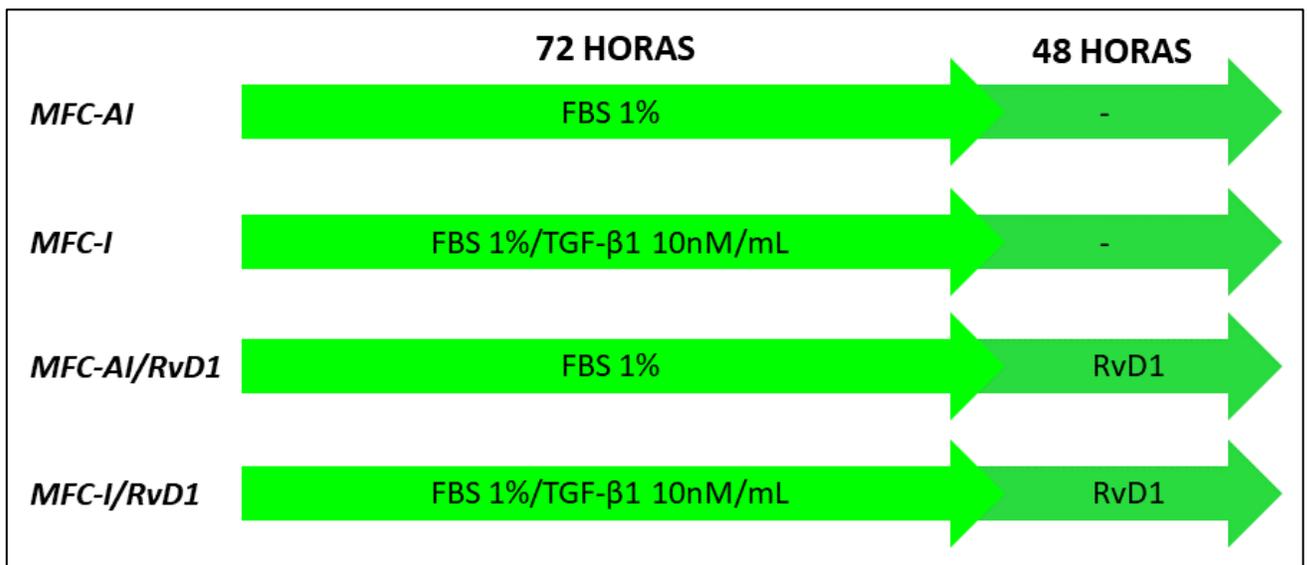
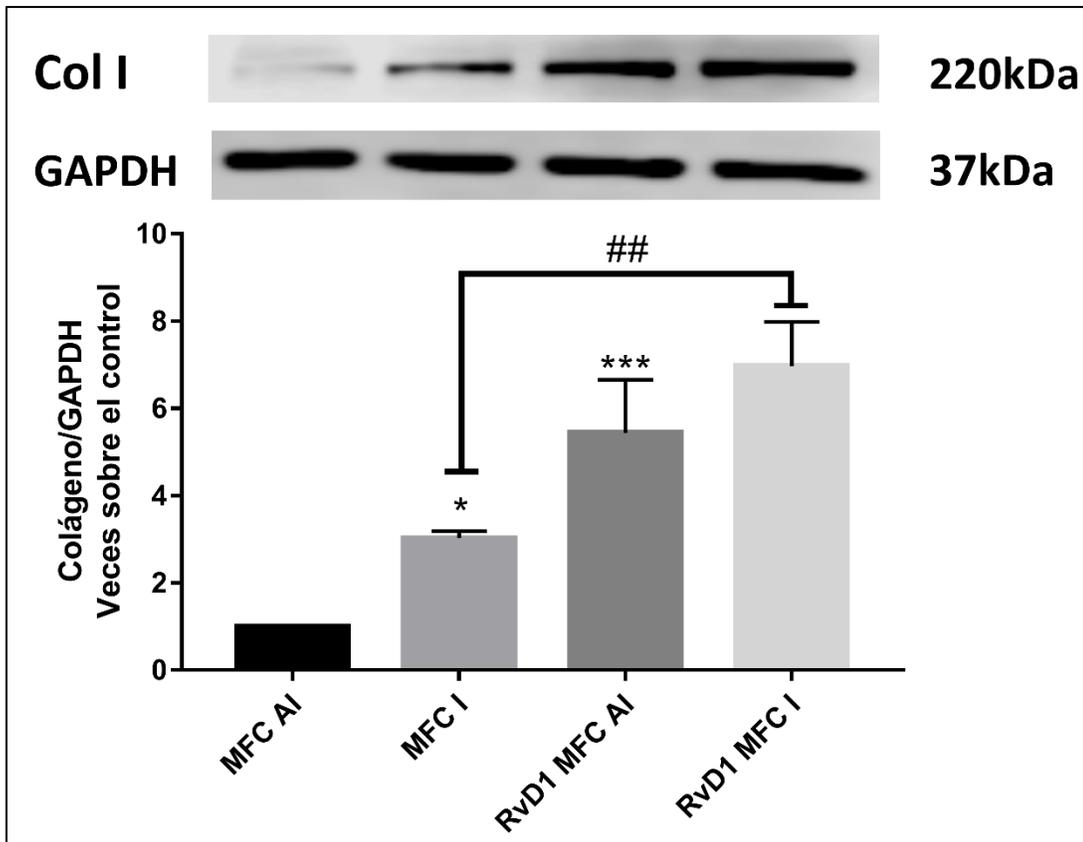


Figura 12. Tratamiento de los distintos grupos experimentales para el experimento del efecto de RvD1 en la expresión de colágeno I en MFC autoinducidos.



**Figura 13. Expresión de colágeno en MFC autoinducidos.** Se trataron MFC-AI y MFC-I con RvD1 100nM en medio F12/FBS 1% por 48 horas, los cuales fueron raspados al mismo tiempo de plaqueo. Se trata como MFC AI a aquel que no fue tratado con TGF- $\beta$ 1 y como MFC-I a aquel que sí se trató con TGF- $\beta$ 1. Se midió colágeno mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \* $p < 0,05$  vs MFC-AI \*\*\* $p < 0,001$  vs MFC-AI ## $p < 0,01$  vs MFC-I. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SD. (n=5)

## 7.- DISCUSIÓN

El proceso de diferenciación de FC a MFC ocurre siempre ante estímulos que resultan nocivos para la célula o el tejido cardiaco, por lo que es común ver una elevada cantidad de MFC en cicatrices producto de una injuria cardiaca. Este proceso, modulado principalmente por TGF- $\beta$ 1, es un mecanismo de defensa por parte del corazón al diferenciar las células que sirven de sostén al tejido cardiaco en unas similares, pero con una mayor capacidad de síntesis y secreción de colágeno y otras proteínas de la MEC. Sin embargo, el cambio en el fenotipo trae consigo cambios adicionales, y como ya ha sido mencionado, además de aumentar la síntesis de ciertas proteínas encargadas de la cicatrización, inducen un aumento en la expresión de diferentes tipos de receptores. Estos cambios originan a su vez, alteraciones en la forma en que la célula es capaz de responder ante los estímulos que activan esos receptores, y abre paso a preguntarse qué otras funciones, además de la síntesis y secreción de proteínas de la MEC, son moduladas por el MFC. En este sentido, y dada la expresión del receptor ALX/FPR2, los mediadores proresolutivos toman vital importancia con la finalidad de terminar con el proceso inflamatorio iniciado. Sin embargo, hasta ahora los estudios siempre se habían realizado en los FC. Por lo tanto, el estudiar qué ocurre en el MFC e indagar si RvD1 es capaz de alterar la principal función de estas células, es decir modular la síntesis de proteínas de matriz extracelular, es de gran interés en vistas de saber si la RvD1 además de disminuir la respuesta inflamatoria sería capaz de modular la respuesta reparativa.

Los principales resultados de esta tesis fueron que tras la diferenciación del FC a MFC, estimulada por TGF- $\beta$ 1, hubo un aumento en los niveles de expresión del receptor para RvD1. Como consecuencia de este aumento, la RvD1 fue capaz de aumentar la secreción de colágeno a través de las vías de señalización PI3K/AKT y ERK1/2.

En FC y MFC la vía ERK1/2 se activó de manera similar; sin embargo, en el MFC se activó significativamente la vía PI3K/AKT, no así en el FC.

La respuesta en la síntesis de colágeno I estimulada por RvD1 también fue diferenciada entre FC y MFC, en la cual solo el MFC tuvo respuesta tanto en aquellos

inducidos por TGF- $\beta$ 1 como en los autoinducidos, no así el FC. Dicha respuesta dependía tanto del receptor ALX/FPR2 como de las vías ER1/2 y PI3K/AKT.

Estos resultados encontrados en esta memoria se discutirán y contrastarán en las siguientes páginas con respecto a lo encontrado en literatura.

### **7.1 TGF- $\beta$ 1 induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y paralelamente un aumento en la expresión del receptor ALX/FPR2**

Nuestro laboratorio ha descrito en distintos estudios diferencias y similitudes entre los FC y los MFC. Por ejemplo, Boza et al., 2016 [49] demostraron que el FC posee un rol proinflamatorio ante LPS; mientras que los MFC se presentan como profibróticos; sin embargo, tanto el FC como el MFC participan en la respuesta inflamatoria ante LPS vía receptor TLR4. En el trabajo de Olmedo et al., 2013 [50] se encontró una respuesta diferenciada entre FC y MFC ante EPAC-1, una proteína que participa activamente en el remodelado cardíaco, en donde se demostraba además la incapacidad de los MFC de migrar, a diferencia nuevamente de los FC. Muñoz et al. demostraron que los niveles de la enzima COX-2, son mayores en MFC que en FC [47]. Además, se ha descrito diferencia en la expresión de distintos receptores en ambos fenotipos. A este respecto, se ha encontrado en literatura que los receptores  $\beta$ 2-AR, B1 de cininas, AT1 de ANG II y TLR4 aumentan tras el paso de FC a MFC [4,47]. Sin embargo, se desconoce si en este proceso de diferenciación, sea con TGF- $\beta$ 1, o con otro estímulo se produce un cambio en la expresión del receptor de RvD1. Así mismo, también se desconoce si otros estímulos que no necesariamente conducen a la diferenciación de FC a MFC son capaces de inducir un aumento en la expresión del receptor ALX/FPR2. A este respecto, LPS, un estímulo fuertemente proinflamatorio, no fue capaz de inducir cambios en la expresión del receptor. Sin embargo, y respecto de los cambios en la expresión del receptor ALX/FPR2, existen varios trabajos en los que se han encontrado resultados opuestos a los nuestros y diferentes a los mostrados en esta tesis. En un estudio realizado en monocitos humanos se demostró que, tras su diferenciación a macrófagos, los niveles del receptor ALX/FPR2 disminuyeron drásticamente; sin embargo, esos mismos macrófagos estimulados con LPS presentaron un gran aumento de la expresión del

mRNA de dicho receptor, aunque ese cambio no fue traducido en un aumento en los niveles proteicos del mismo, mostrando una inhibición postranscripcional en la síntesis del receptor [45]. Por otro lado, en células microgliales se describió que LPS aumentó tanto los niveles de mRNA como los de proteína [51]. Del mismo modo, TNF- $\alpha$ , otro mediador proinflamatorio, aumento de manera similar los niveles del mRNA y proteína en células microgliales de murinos [52]. Por lo tanto, con estos resultados en su conjunto se puede concluir que los cambios inducidos en la expresión del receptor ALX/FPR2 por LPS son dependientes tanto del tipo celular.

En cuanto a los efectos de TGF- $\beta$ 1, existe poca evidencia en la literatura y tampoco existe un consenso en cuanto a sus efectos sobre el receptor ALX/FPR2. El mismo estudio en células microgliales [51] demostró que TGF- $\beta$ 1 a través de la activación de las vías SMAD3 y ERK1/2, fue capaz de inhibir la expresión de FPR2 estimulada por LPS; mientras que otro estudio, también en microglía, se demostró que la disminución en la expresión de TGF- $\beta$ 1 induciría una reducción en los niveles de FPR2 [53].

Para el caso de ANG II, no existen datos en la literatura que permita contrastar con nuestros resultados; sin embargo, es muy bien conocido que el aumento en los niveles de ANG II conlleva a un aumento en los niveles de TGF- $\beta$ 1, por lo que la respuesta al menos vista en esta tesis resultan coherentes y podría ser, que los efectos de ANG II fuesen indirectos y mediados, al menos, por el efecto autocrino de la secreción de TGF- $\beta$ .

Para RvD1 tampoco se encontró evidencia que relacionara a ésta con la expresión del receptor ALX/FPR2; sin embargo, es importante destacar que el resultado encontrado indica que no existiría una auto regulación del receptor (feedback) ni negativo ni positivo.

Por lo tanto, con estos resultados en su conjunto se puede concluir que los cambios inducidos en la expresión del receptor ALX/FPR2 son dependientes tanto del tipo celular como del estímulo utilizado. Sin embargo, es claro y coincidente con nuestros hallazgos que el receptor sí puede variar su expresión, ante distintos estímulos y procesos [54].

## 7.2 Evaluación de las vías de señalización estimuladas por RvD1

Las vías de señalización intracelular ERK1/2 y PI3K/AKT se encuentran muy bien estudiadas en FC y MFC, y se les ha descrito participación en una infinidad de procesos [55-58]. En particular, en el FC la activación de ERK1/2 se ha sido estimulada por la activación del receptor  $\beta$ 2-AR y AT1-R de ANG II [4]. Sin embargo, no es muy clara la evidencia que existe al relacionar estas vías con RvD1 y su receptor ALX/FPR2. Nuestros resultados muestran que RvD1 es capaz de activar la vía ERK1/2 tanto en FC como en MFC, comportándose en ambos de manera muy similar; sin embargo, la vía PI3K/AKT no fue activada por RvD1 en FC, pero sí en el MFC. En primera instancia, es factible proponer que esta diferencia se deba a la mayor cantidad del receptor ALX/FPR2 que hay en el MFC, indicando así que la vía PI3K/AKT requeriría un mayor nivel de expresión de receptores para generar efectos a nivel transcripcional. Antecedentes similares fueron encontrados en un trabajo previo del laboratorio realizado por Olmedo et al. (2013) en donde se muestra una respuesta diferenciada en FC y MFC con respecto a esta vía. En ese estudio se estimuló con TGF- $\beta$ 1 y se midieron los niveles de expresión de EPAC-1 en FC y MFC. Los resultados mostraron que en el FC al utilizar el inhibidor LY294002, inhibidor de PI3K, no se revirtieron los efectos de TGF- $\beta$ 1 en los niveles de EPAC-1, pero sí ocurrió significativamente en fibroblasto [50]. Si bien el estudio no se relaciona con RvD1, sí da cuenta de que, en este mismo fenotipo celular, existen antecedentes en cuanto a las diferencias relacionadas con la activación de la vía PI3K/AKT.

En cuanto a la vía ERK1/2 existen evidencias dispares, pues ha sido observado en células calciformes de la conjuntiva que la RvD1 es capaz de activar esta vía [35], lo que se condice con los resultados obtenidos en esta tesis. Sin embargo, en la gran mayoría de los trabajos se observa que RvD1 tiene la capacidad para disminuir la activación de ERK1/2. En este sentido, en un modelo de daño renal agudo en ratones, LPS activó la vía ERK1/2 y RvD1 inhibió esta activación [59]. Del mismo modo, en células calciformes de la conjuntiva histamina activó la vía ERK1/2, y AT-RvD1, un tipo de RvD1 gatillada por aspirina, redujo la actividad de ERK1/2 inducida por histamina [60].

En contraste con las discordancias que existen en relación a la vía ERK1/2 y la activación por la RvD1; en la literatura revisada se encontró que la activación del receptor ALX/FPR2 por RvD1 desencadenó una activación de la vía PI3K/AKT. Como, por ejemplo, en modelo de isquemia/reperfusión de hígado en ratas, la activación de ALX/FPR2 por RvD1 conllevó a un aumento en la actividad de la vía PI3K/AKT y consecuentemente a una reducción de la apoptosis, mientras que la inhibición de dicha vía evitó todos los efectos de RvD1 [61]. Estos resultados son similares a lo ocurrido en otros tipos celulares, como en células epiteliales alveolares [62], epitelio salival [63] y en un modelo de isquemia/reperfusión miocárdica en ratas adultas donde RvD1 activó la vía PI3K/AKT y redujo el tamaño del infarto; mientras que la inhibición de esa vía eliminó completamente la respuesta de RvD1 [64].

En conclusión, estos resultados en su conjunto demuestran que existen diferencias en cuanto a la activación de las vías PI3K/AKT y ERK1/2 tanto en los efectos de RvD1, como a las diferencias observadas entre FC y MFC. Esta diferencia puede tener importantes implicancias en las funciones celulares reguladas por ambas vías de señalización, y en particular en el FC y MFC en funciones celulares asociadas a procesos de cicatrización.

### **7.3 Efecto de RvD1 sobre la síntesis de colágeno en FC y MFC**

Es bien sabido que los MFC respecto de los FC tienen mayor capacidad para sintetizar colágeno, lo que se explica al entender que este fenotipo celular se presentan solamente en zonas de daño tisular, donde se requiere de un rápido proceso de reparación tisular. La homeostasis de la MEC es un proceso altamente controlado en el que la síntesis/degradación de colágeno toma mucha importancia. Sin embargo, un desbalance hacia el aumento de la síntesis de colágeno se suele relacionar directamente con el comienzo de un proceso fibrótico, mientras que su disminución se establece como algo beneficioso pues indicaría una reversión de un proceso fibrótico. Los resultados de esta memoria muestran que RvD1 es capaz de aumentar significativamente la síntesis de colágeno I en MFC, pero no en FC. En este sentido, en varios estudios la literatura da cuenta que RvD1 es capaz de disminuir los niveles de colágeno. En un estudio de fibrosis renal, inducida por obstrucción ureteral en

ratones, se demostró que la RvD1 disminuyó el depósito de colágeno I [14]. Así mismo, en un modelo de infarto miocárdico en ratón, la RvD1 también disminuyó el depósito de colágeno, y la consiguiente fibrosis del tejido [65]. Resultados similares se han demostrado en un modelo de daño endotelial en riñón de ratón [46], en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratón [66], en cultivo de fibroblasto pulmonar humano [44]. Lo que deja en claro los resultados de esta memoria, son en primera instancia contradictorios a los reportados en literatura, esto podría ser explicado por varias causas entre ellas, la gran cantidad de datos obtenidos son en modelos *in vivo*, y por consiguiente la respuesta observada, es compleja y no dependiente de un único tipo celular, mientras que en los ensayos *in vitro* son específicos y células dependientes. Por otro lado, puede existir una exposición a RvD1 por tiempos más prolongados que los estudiados, mientras que estos resultados fueron solo *in vitro*. En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos reportado que la RvD1 tiene la capacidad de disminuir los niveles de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, Ruz Cortés (2017) [67] y Espinoza (2018) [68]. Ante nuestros resultados y la dispar información encontrada cabe preguntarse si la concentración utilizada de RvD1 tendrá alguna implicancia en lo observado, sin embargo al revisar literatura nos encontramos que fisiológicamente RvD1 se encuentra en un rango que varía entre la escala de los pg a ng, siendo su concentración efectiva 50 de aproximadamente  $1,2 \times 10^{-12} \text{M}$  en un modelo de células b-arrestina [69], además en varios ensayos para alcanzar la EC80 de RvD1 para ALX se utiliza una concentración de 100nM de RvD1, como por ejemplo en algunos realizados en células de aorta de rata, arteria pulmonar de humanos y monocitos [70, 71], es por esto y por antecedentes previos de laboratorio donde se midió viabilidad celular al utilizar RvD1 en estas dosis o mayores, concluyendo que RvD1 no era tóxica, es que se utiliza dicha concentración en esta tesis. [72]

La fibrosis es un proceso complejo que ocurre ante una inflamación crónica, con una larga y descontrolada exposición a mediadores proinflamatorios, desencadenando una deposición de proteínas de matriz no estructurada, sin eliminación de los factores que iniciaron la inflamación [73]. Es por esto que es interesante proponer que tal vez la respuesta de la RvD1 al aumentar colágeno en los MFC tendría un potencial efecto en pro de la cicatrización y/o profibrótico. Por otro lado, que este efecto no se presente

en los FC indicaría que en ese fenotipo podría estar primando una respuesta antiinflamatoria propia de las Resolvinas; sin embargo, una vez producido el daño y producida la diferenciación, la respuesta que se busca es una rápida reparación del tejido dañado, lo que se logra con una mayor síntesis y deposición de proteínas de matriz. Por otro lado, sería interesante evaluar la respuesta pro-resolutiva de RvD1 en el MFC y determinar si los efectos a nivel de la respuesta inmune se mantienen en comparación con el FC. En este sentido, Boza et al. [49], demostraron que los MFC tienen la misma capacidad para secretar IL-1  $\beta$  respecto de los FC. Del mismo modo, Humeres et al. [74], demostraron que la respuesta de los FC a LPS o a TGF- $\beta$ 1 es absolutamente diferente que, en los MFC en términos del tipo de citoquinas secretadas, así como también en el nivel de secreción de las mismas. Este trabajo demostró que los FC son más proinflamatorios, mientras que los MFC son más profibroticos. Sin embargo, si la respuesta de los MFC a la RvD1 es similar o distinta en términos de la respuesta antiinflamatoria es una pregunta que queda para ser resuelta. Por lo tanto, sería interesante determinar si además del efecto en la deposición de proteínas de matriz ocurren cambios en los efectos de la RvD1 en la secreción de citoquinas.

Por último, se ha descrito ampliamente en literatura al WRW4 como antagonista del receptor ALX/FPR2 [49,75-78], el cual era necesario utilizar para demostrar que las acciones evidenciadas por efecto de RvD1 y presentadas en esta tesis ocurren a través del receptor ALX/FPR2. Como se puede ver en la figura 10 WRW4 evita completamente el aumento de colágeno estimulado por RvD1 en los MFC. Esto coincide con lo descrito anteriormente, y además con la basta literatura que indica que este mediador actúa mediante ALX/FPR2, siendo algunos de esos trabajos ya discutidos previamente [44,79]. Además de esto existe evidencia en otras líneas celulares que RvD1 es capaz de activar y tener acciones a diferentes niveles mediante ALX/FPR2, como, por ejemplo, en leucocitos disminuye la polimerización de fibras de actina estimulada por toxina pertussis a través de FPR2 [80] o en muestras de tejido de pulmón RvD1 inhibió la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y los aumentos de NF- $\kappa$ B p65 estimulado por LPS, también a través del receptor ALX/FPR2. [81]

#### 7.4 Evaluación de la síntesis de colágeno en MFC autoinducidos.

El corazón tiene una compleja estructura tisular en la cual la MEC da soporte un biomecánico único a las células contráctiles, lo suficientemente rígido como para soportar las grandes cargas mecánicas, pero a la vez adecuadas para permitir su función de bombeo, por lo que es casi imposible de replicar en cultivos celulares dichas condiciones. A modo de ejemplo, una placa de cultivo de poliestireno es mil veces más rígida que el tejido cardíaco fibrótico [82]. El FC es una célula que se activa ante algunos estímulos proinflamatorios, como también por estímulos mecánicos, pues posee mecano-sensores, como las integrinas, que une el citoesqueleto a la MEC, permitiendo que los FC sean capaces de percibir la resistencia mecánica del ambiente [83]. Por esta razón *in vitro* ocurre una activación de los fibroblastos independiente de los estímulos, pues la placa provee una resistencia a las fuerzas de tracción de la célula [84]. Este mecanismo se conoce como mecanotransducción [85], el cuál involucra a las integrinas y la contracción celular y genera una respuesta por parte de la célula liberando ciertas citoquinas, entre ellas TGF- $\beta$ 1, la cual, como se ha mostrado en varias ocasiones en esta memoria es la mayor citoquina que induce la diferenciación de FC a MFC [86]. Este proceso ocurre con la activación de TGF- $\beta$ 1 latente en un mecanismo complejo regulado por integrinas [87]. Por estas razones, era interesante estudiar si la respuesta observada en los MFC inducidos por TGF- $\beta$ 1 tendría alguna diferencia en MFC autoinducidos (MFC AI) a causa del estrés mecánico en el tiempo y la consiguiente liberación de la misma citoquina por parte de la célula. El resultado (Figura 9) muestra que la respuesta, estadísticamente, en ambos es igual, dado que no hay diferencia significativa entre el MFC autoinducido y el inducido (MFC I) por TGF- $\beta$ 1, a pesar de que gráficamente en el último grupo se puede observar un mayor aumento. Esta misma respuesta es posible observar en FC tratados con RvD1 en función del tiempo (Figura 6), demostrándose que a las 72 horas (mayor tiempo de plaqueo), pareciera que comienza en ese tiempo ya a existir una respuesta a RvD1.

Con este último resultado obtenido quedan muchas preguntas por resolver, que lamentablemente en este trabajo no alcanzaron a ser abordados, pero que es interesante plantear: ¿En los MCF-AI existe un nivel de expresión similar del receptor

ALX/FPR2 que en los MFC-I?¿RvD1 responderá de igual manera en la activación de las vías de señalización estudiadas en los MFC-AI como en los MFC-I?¿Será exactamente igual trabajar en MFC-AI que con MFC-I?, todas estas preguntas quedan para ser resueltas en trabajos futuros.

Finalmente, en la figura 13 se muestra a modo esquemático los principales resultados de esta tesis: En primera instancia se observa la activación de la vía ERK1/2 luego del estímulo con RvD1 en el FC; sin embargo, no se observan cambios en la expresión de colágeno. Posteriormente tras la diferenciación de FC a MFC por TGF- $\beta$ 1 y/o a causa del estrés mecánico, se evidencia un aumento en la expresión del receptor ALX/FPR2. Luego al estimular los MFC con RvD1 se evidencia una activación de la vía ERK1/2 al igual que en FC, pero además se observa una activación de la vía PI3K/AKT y un aumento en los niveles de colágeno I, a diferencia de lo que ocurre en el FC ante el mismo estímulo. Finalmente se comprueba que dicho aumento en la expresión de colágeno visto en el MFC ocurre a través del receptor ALX/FPR2, y las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/AKT, tras la utilización del antagonista para el receptor, WRW4, y los inhibidores de ERK1/2 y PI3K/AKT, PD98059 (PD) y LY294002 (LY), respectivamente.

## 8. ESQUEMA RESUMEN

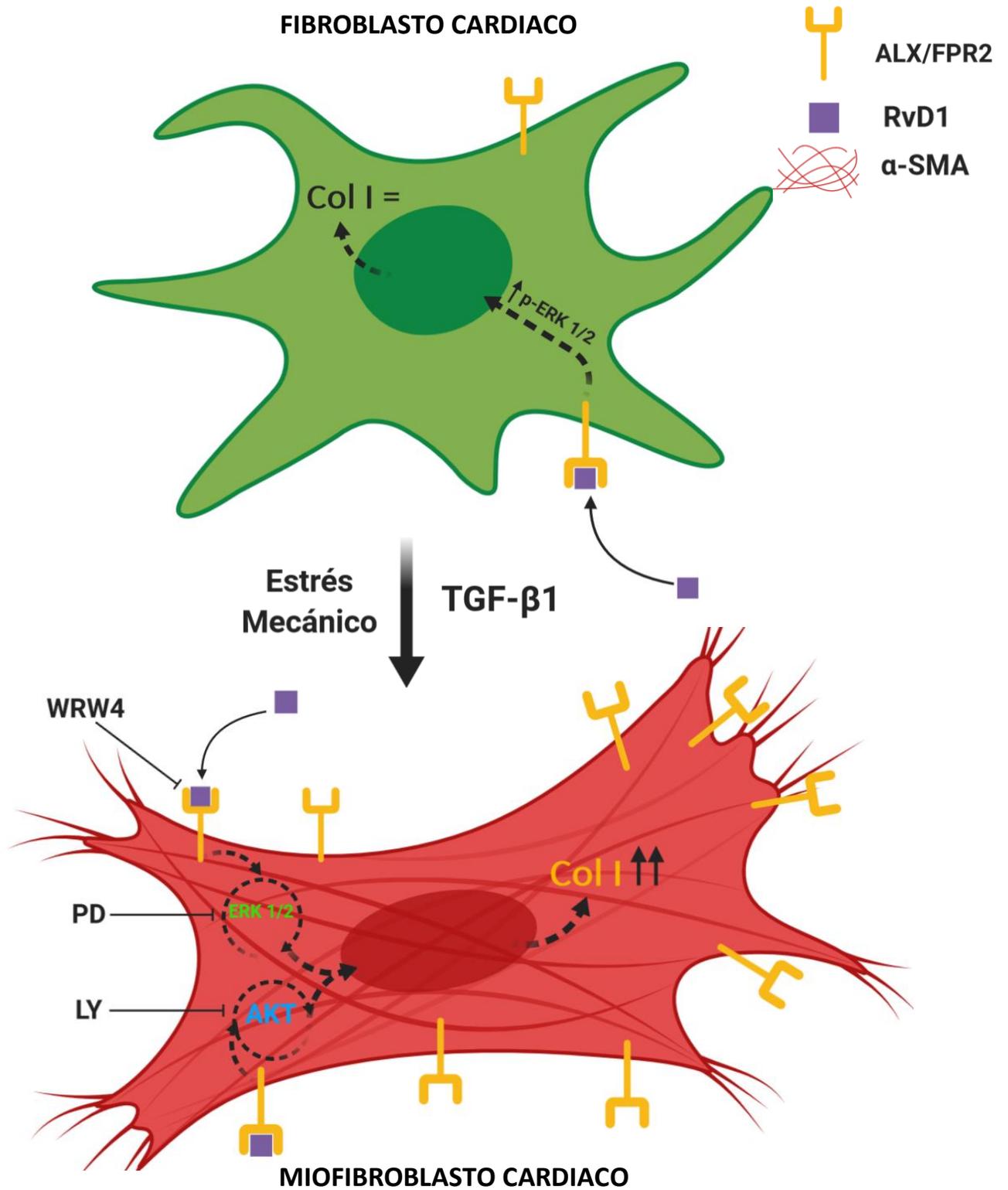


Figura 14. Esquema resumen de los efectos diferenciales de la RvD1 sobre la expresión de colágeno en FC y MFC.

## 9.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

1. TGF- $\beta$ 1 induce la diferenciación de FC a MFC, aumentando los niveles de  $\alpha$ -SMA
2. Paralelamente esta diferenciación de FC a MFC, incrementa los niveles de expresión del receptor para RvD1, ALX/FPR2
3. En FC y MFC, la RvD1 activa la vía ERK1/2, mientras que la vía PI3K/AKT sólo se activa en MFC.
4. La RvD1 incrementa la síntesis de colágeno I sólo en los MFC.
5. La RvD1 a través del receptor ALX/FPR2 y las vías ERK1/2 y PI3K/AKT incrementan la síntesis de colágeno en los MFC.
6. RvD1 aumenta la síntesis de colágeno I en MFC autoinducidos.

### Proyecciones

Los resultados obtenidos en esta tesis dan cuenta de la importante participación de RvD1 en el proceso fibrótico; sin embargo, queda por dilucidar en investigaciones futuras qué rol tiene RvD1 en los MFC en cuanto a la respuesta inflamatoria, qué respuesta tendrá RvD1 a nivel fisiológico con modelos *in vivo* y definir si un potencial agonista o antagonista sintético para el receptor ALX/FPR2 sería útil en el tratamiento de patologías cardiovasculares. Por esto RvD1 y su receptor siguen siendo un interesante blanco terapéutico.

## 10.- REFERENCIAS

- [1] Serhan, C. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503), 92-101. doi: 10.1038/nature13479
- [2] Enfermedades crónicas. (2019). Retrieved 13 September 2019, from [https://www.who.int/topics/chronic\\_diseases/es/](https://www.who.int/topics/chronic_diseases/es/)
- [3] Ivey, M. J., & Tallquist, M. D. (2016). Defining the Cardiac Fibroblast. *Circulation Journal*, 80(11), 2269-2276.
- [4] Díaz-Araya G, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S, Muñoz C. Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions.
- [5] Tarbit, E., Singh, I., Peart, J., & Rose'Meyer, R. (2018). Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Failure Reviews*, 24(1), 1-15. doi: 10.1007/s10741-018-9720-1
- [6] Santiago, J., Dangerfield, A., Rattan, S., Bathe, K., Cunnington, R., & Raizman, J. et al. (2010). Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation *in vivo* and *in vitro*: Expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Developmental Dynamics*, 239(6), 1573-1584. doi: 10.1002/dvdy.22280
- [7] Cherg S, Young J, Ma H. (2008) Alpha-Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). *Journal of American Science*. 4(4):7-9.
- [8] Bai, J., Zhang, N., Hua, Y., Wang, B., Ling, L., Ferro, A., & Xu, B. (2013). Metformin Inhibits Angiotensin II-Induced Differentiation of Cardiac Fibroblasts into Myofibroblasts. *Plos ONE*, 8(9), 1-7.
- [9] Porter, K. E., and Turner, N. A. (2009) Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling, *Pharmacol Ther* 123, 255-278.

- [10] Bolívar, S., Santana, R., Ayala, P., Landaeta, R., Boza, P., & Humeres, C. et al. (2017). Lipopolysaccharide Activates Toll-Like Receptor 4 and Prevents Cardiac Fibroblast-to-Myofibroblast Differentiation. *Cardiovascular Toxicology*, 17(4), 458-470. doi: 10.1007/s12012-017-9404-4
- [11] Meng, X., Nikolic-Paterson, D., & Lan, H. (2016). TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), 325-338. doi: 10.1038/nrneph.2016.48
- [12] Muthusamy, B., Budi, E., Katsuno, Y., Lee, M., Smith, S., & Mirza, A. et al. (2015). ShcA Protects against Epithelial–Mesenchymal Transition through Compartmentalized Inhibition of TGF- $\beta$ -Induced Smad Activation. *PLOS Biology*, 13(12), e1002325. doi: 10.1371/journal.pbio.1002325
- [13] Cherg S, Young J, Ma H. (2008) Alpha-Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). *Journal of American Science*. 4(4):7-9.
- [14] Qu, X., Zhang, X., Yao, J., Song, J., Nikolic-Paterson, D., & Li, J. (2012). Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation. *The Journal of Pathology*, 228(4), 506-519. doi: 10.1002/path.4050
- [15] Grinnell, F. (1994) Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction, *J Cell Biol* 124, 401-404.
- [16] Redden, R. A., and Doolin, E. J. (2003) Collagen crosslinking and cell density have distinct effects on fibroblast-mediated contraction of collagen gels, *Skin Res Technol* 9, 290-293.
- [17] Rodriguez-Feo, J., Sluijter, J., Kleijn, D., & Pasterkamp, G. (2005). Modulation of Collagen Turnover in Cardiovascular Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 11(19), 2501-2514.

- [18] Liao, Z., Dong, J., Wu, W., Yang, T., Wang, T., Guo, L., Chen, L., Xu, D. and Wen, F. (2012). Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B pathway. *Respiratory Research*, 13(1), p.110.
- [19] Voigt, P., Brock, C., Nürnberg, B., & Schaefer, M. (2004). Assigning Functional Domains within the p101 Regulatory Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase  $\gamma$ . *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 5121-5127. doi: 10.1074/jbc.m413104200
- [20] Eblen, S., Slack, J., Weber, M., & Catling, A. (2002). Rac-PAK Signaling Stimulates Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Activation by Regulating Formation of MEK1-ERK Complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 22(17), 6023-6033. doi: 10.1128/mcb.22.17.6023-6033.2002
- [21] Samatar, A., & Poulikakos, P. (2014). Targeting RAS–ERK signalling in cancer promises and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(12), 928-942. doi: 10.1038/nrd4281
- [22] Janku, F., Yap, T., & Meric-Bernstam, F. (2018). Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(5), 273-291. doi: 10.1038/nrclinonc.2018.28
- [23] Kanta, J. (2015). Collagen matrix as a tool in studying fibroblastic cell behavior. *Cell Adhesion & Migration*, 9(4), 308–316. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.100546955>
- [24] Lim, I. J., Phan, T., Tan, E., Nguyen, T. T., Tran, E., Longaker, M. T., . . . Huynh, H. (2003). Synchronous Activation of ERK and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways Is Required for Collagen and Extracellular Matrix Production in Keloids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40851–40858. <https://doi.org/10.1074/jbc.m305759200>

[25] Suto, M., Masutomi, H., Ishihara, K., & Masaki, H. (2019). A Potato Peel Extract Stimulates Type I Collagen Synthesis via Akt and ERK Signaling in Normal Human Dermal Fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(9), 1510–1516. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00193>

[26] Masamune, A., Kikuta, K., Watanabe, T., Satoh, K., Hirota, M., Hamada, S., & Shimosegawa, T. (2008). Fibrinogen induces cytokine and collagen production in pancreatic stellate cells. *Gut*, 58(4), 550–559. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.154401>

[27] Tsai, K., Kao, S., Wang, C., Wang, Y., Wang, J., & Hung, S. (2010). Type I collagen promotes proliferation and osteogenesis of human mesenchymal stem cells via activation of ERK and Akt pathways. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 9999A, 673–682. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32693> [45] Sun, Y., Qu, X., Li, X.,

[28] Serhan C. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92-101.

[29] Hong S, Gronert K, Devchand P, Moussignac R-L, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood and glial cells: autacoids in antiinflammation. *J Biol Chem* 2003; 278: 14677–87

[30] Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, Higuchi A, Hong S, Pravda EA, Majchrzak S, Carper D, Hellstrom A, Kang JX, Chew EY, Salem NN Jr, Serhan CN, Smith LEH. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 2007; 13: 868–73.

[31] Chiang N., Takano T., Arita M., Watanabe S., Serhan C. (2003). A novel rat lipoxin A4 receptor that is conserved in structure and function. *British Journal Of Pharmacology*, 139, 89-98.

[32] Khaled, M., Shibani, N., Labban, N., Batarseh, G., Song, F., Ruby, J., & Windsor, L. (2013). Effects of Resolvin D1 on Cell Survival and Cytokine Expression of Human Gingival Fibroblasts. *Journal Of Periodontology*, 84(12), 1838-1846. doi: 10.1902/jop.2013.120388

[33] Serhan, C. (2009). Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, 7, 44–48.

[34] Chiang N, Serhan C. (2017) Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Molecular Aspects of Medicine*. 1-16

[35] Lippestad, M., Hodges, R., Utheim, T., Serhan, C., & Dartt, D. (2017). Resolvin D1 Increases Mucin Secretion in Cultured Rat Conjunctival Goblet Cells via Multiple Signaling Pathways. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(11), 4530. doi: 10.1167/iovs.17-21914

[36] Wu D, Zheng S, Li W, et al. Novel biphasic role of resolvin D1 on expression of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated lung fibroblasts is partly through PI3K/AKT and ERK2 pathways. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:964012.

[37] Gilbert, K., Bernier, J., Bourque-Riel, V., Malick, M., & Rousseau, G. (2015). Resolvin D1 Reduces Infarct Size Through a Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B Mechanism. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*, 66(1), 72-79. doi: 10.1097/fjc.0000000000000245

[38] Cooray, S., Gobbetti, T., Montero-Melendez, T., McArthur, S., Thompson, D., & Clark, A. et al. (2013). Ligand-specific conformational change of the G-protein–coupled

receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 110(45), 18232–18237.

[39] Krishnamoorthy, S., et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(4):1660-1665. 2010.

[40] Serhan, C., et al. Novel anti-inflammatory pro-resolving mediators and their receptors. *Current Topics on Medicinal Chemistry*. 11: 629-647. 2011.

[41] Spite, M., Clária, J., Serhan, C. Resolvins, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and their Potential Roles in Metabolic Diseases. *Cell Metabolism*. 19: 21-36. 2015.

[42] Fredman, G., et al. Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B4 synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111: 14530-14535. 2014.

[43] Hodges, R., Li, D., Shatos, M., Bair, J., Lippestad, M., Serhan, C., & Dartt, D. (2017). Lipoxin A4 activates ALX/FPR2 receptor to regulate conjunctival goblet cell secretion. *Mucosal Immunology*, 10(1), 46-57.

[44] Zheng, S., Wang, Q., D'Souza, V., Bartis, D., Dancer, R., & Parekh, D. et al. (2017). ResolvinD1 stimulates epithelial wound repair and inhibits TGF- $\beta$ -induced EMT whilst reducing fibroproliferation and collagen production. *Laboratory Investigation*, 98(1), 130-140.

[45] Waechter, V., Schmid, M., Herova, M., Weber, A., Günther, V., & Marti-Jaun, J. et al. (2012). Characterization of the Promoter and the Transcriptional Regulation of the Lipoxin A4 Receptor (FPR2/ALX) Gene in Human Monocytes and Macrophages. *The Journal Of Immunology*, 188(4), 1856-1867. doi: 10.4049/jimmunol.1101788

[46] Nikolic-Paterson, D., & Li, J. (2013). Endothelial Dysfunction Exacerbates Renal Interstitial Fibrosis through Enhancing Fibroblast Smad3 Linker Phosphorylation in the Mouse Obstructed Kidney. *Plos ONE*, 8(12), 1-17.

[47] Muñoz-Rodríguez, C., Fernández, S., Osorio, J., Olivares, F., Anfossi, R., & Bolivar, S. et al. (2018). Expression and function of TLR4- induced B1R bradykinin receptor on cardiac fibroblasts. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 351, 46-56. doi: 10.1016/j.taap.2018.05.011

[48] (2019). Revisado el 29 de Octubre de 2019, desde <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>

[49] Boza, P., Ayala, P., Vivar, R., Humeres, C., Cáceres, F., & Muñoz, C. et al. (2016). Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 $\beta$  synthesis, secretion, and degradation. *Molecular Immunology*, 74, 96-105. doi: 10.1016/j.molimm.2016.05.00156

[50] Olmedo, I., Muñoz, C., Guzmán, N., Catalán, M., Vivar, R., & Ayala, P. et al. (2013). EPAC expression and function in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 272(2), 414-422. doi: 10.1016/j.taap.2013.06.022

[51] Le, Y., Iribarren, P., Gong, W., Cui, Y., Zhang, X., & Wang, J. (2004). TGF- $\beta$ 1 Disrupts Endotoxin Signaling in Microglial Cells through Smad3 and MAPK Pathways. *The Journal Of Immunology*, 173(2), 962-968. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.962

[52] Cui, Y., Le, Y., Zhang, X., Gong, W., Abe, K., & Sun, R. et al. (2002). Up-Regulation of FPR2, a Chemotactic Receptor for Amyloid  $\beta$  1–42 (A $\beta$ 42), in Murine Microglial Cells by TNF $\alpha$ . *Neurobiology Of Disease*, 10(3), 366-377. doi: 10.1006/nbdi.2002.0517

[53] Paglinawan, R., Malipiero, U., Schlapbach, R., Frei, K., Reith, W., & Fontana, A. (2003). TGF $\beta$  directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. *Glia*, 44(3), 219-231. doi: 10.1002/glia.10286

[54] Zhang, L., Wang, G., Chen, X., Xue, X., Guo, Q., Liu, M., & Zhao, J. (2017). Formyl peptide receptors promotes neural differentiation in mouse neural stem cells by ROS generation and regulation of PI3K-AKT signaling. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-00314-5

[55] Dent, P. (2014). Crosstalk between ERK, AKT, and cell survival. *Cancer Biology & Therapy*, 15(3), 245-246. doi: 10.4161/cbt.2754157

[56] Rai, S., Dilnashin, H., Birla, H., Singh, S., Zahra, W., & Rathore, A. et al. (2019). The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. *Neurotoxicity Research*, 35(3), 775-795. doi: 10.1007/s12640-019-0003-y

[57] D'Oria, R., Laviola, L., Giorgino, F., Unfer, V., Bettocchi, S., & Scioscia, M. (2017). PKB/Akt and MAPK/ERK phosphorylation is highly induced by inositols: Novel potential insights in endothelial dysfunction in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 10, 107-112. doi: 10.1016/j.preghy.2017.07.001

[58] Asati, V., Mahapatra, D., & Bharti, S. (2016). PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 109, 314-341. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.01.012

[59] Chen, J., Shetty, S., Zhang, P., Gao, R., Hu, Y., & Wang, S. et al. (2014). Aspirin-triggered resolvin D1 down-regulates inflammatory responses and protects against endotoxin-induced acute kidney injury. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 277(2), 118-123. doi: 10.1016/j.taap.2014.03.017

- [60] Li, D., Hodges, R., Jiao, J., Carozza, R., Shatos, M., & Chiang, N. et al. (2013). Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 regulate histamine-stimulated conjunctival goblet cell secretion. *Mucosal Immunology*, 6(6), 1119-1130. doi: 10.1038/mi.2013.7
- [61] Zhang, T., Shu, H., Chang, L., Ye, F., Xu, K., & Huang, W. (2015). Resolvin D1 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *International Immunopharmacology*, 28(1), 322-327. doi: 10.1016/j.intimp.2015.06.017
- [62] Xie, W., Wang, H., Liu, Q., Li, Y., Wang, J., Yao, S., & Wu, Q. (2016). ResolvinD1 reduces apoptosis and inflammation in primary human alveolar epithelial type 2 cells. *Laboratory Investigation*, 96(5), 526-536. doi: 10.1038/labinvest.2016.3158
- [63] Odusanwo, O., Chinthamani, S., McCall, A., Duffey, M., & Baker, O. (2012). Resolvin D1 prevents TNF- $\alpha$ -mediated disruption of salivary epithelial formation. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 302(9), C1331-C1345. doi: 10.1152/ajpcell.00207.2011
- [64] Gilbert, K., Bernier, J., Bourque-Riel, V., Malick, M., & Rousseau, G. (2015). Resolvin D1 Reduces Infarct Size Through a Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B Mechanism. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*, 66(1), 72-79. doi: 10.1097/fjc.0000000000000245
- [65] Kain, V., Ingle, K., Colas, R., Dalli, J., Prabhu, S., & Serhan, C. et al. (2015). Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, 84, 24-35. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.003

- [66] Yatomi, M., Hisada, T., Ishizuka, T., Koga, Y., Ono, A., & Kamide, Y. et al. (2015). 17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Physiological Reports*, 3(12). doi: 10.14814/phy2.12628
- [67] Resolvina-R1 previene el aumento de icam-1 inducido por angiotensina ii en fibroblastos cardíacos de rata adulta. Ruz Cortés F. (2017)
- [68] Efectos de Resolvinas D1 y E1 sobre la expresión de factores proinflamatorios en fibroblastos cardíacos. Espinoza Pérez C. (2018)
- [69] N. Serhan, C., Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., & Chiang, N. (2011). Novel Anti-Inflammatory-Pro-Resolving Mediators and Their Receptors. *Current Topics In Medicinal Chemistry*, 11(6), 629-647. doi: 10.2174/1568026611109060629
- [70] Jannaway, M., Torrens, C., Warner, J., & Sampson, A. (2018). Resolvin E1, resolvin D1 and resolvin D2 inhibit constriction of rat thoracic aorta and human pulmonary artery induced by the thromboxane mimetic U46619. *British Journal Of Pharmacology*, 175(7), 1100-1108. doi: 10.1111/bph.14151
- [71] Gu, Z., Lamont, G., Lamont, R., Uriarte, S., Wang, H., & Scott, D. (2016). Resolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3 $\beta$  anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes. *Innate Immunity*, 22(3), 186-195. doi: 10.1177/1753425916628618
- [72] Muñoz, N. (2017). Resolvina D1 disminuye la adhesión de SMC sobre fibroblastos cardíacos en ratas neonatas. Universidad de Chile.
- [73] Wynn, T., & Ramalingam, T. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*, 18(7), 1028-1040. doi: 10.1038/nm.2807

[74] Humeres, C., Vivar, R., Boza, P., Muñoz, C., Bolivar, S., & Anfossi, R. et al. (2016). Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, 101, 69-80. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.10.014

59

[75] Zhang, Z., Hu, X., Qi, X., Di, G., Zhang, Y., Wang, Q., & Zhou, Q. (2018). Resolvin D1 promotes corneal epithelial wound healing and restoration of mechanical sensation in diabetic mice. *Molecular vision*, 24, 274–285.

[76] Kain, V., Jadapalli, J., Tourki, B., & Halade, G. (2019). Inhibition of FPR2 impaired leukocytes recruitment and elicited non-resolving inflammation in acute heart failure. *Pharmacological Research*, 146, 104295. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104295

[77] Deyama, S., Ishikawa, Y., Yoshikawa, K., Shimoda, K., Ide, S., Satoh, M., & Minami, M. (2017). Resolvin D1 and D2 Reverse Lipopolysaccharide-Induced Depression-Like Behaviors Through the mTORC1 Signaling Pathway. *International Journal Of Neuropsychopharmacology*, 20(7), 575-584. doi: 10.1093/ijnp/pyx023

[78] Shin, E., Lee, H., Kim, S., Jo, S., Kim, M., & Park, K. et al. (2006). Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp antagonizes formyl peptide receptor like 2-mediated signaling. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 341(4), 1317-1322. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.098

[79] Herrera, B., Kantarci, A., Zarrouh, A., Hasturk, H., Leung, K., & Van Dyke, T. (2015). LXA4 actions direct fibroblast function and wound closure. *Biochemical And Biophysical*

[80] Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., Chiang, N., Yacoubian, S., Lee, C., & Yang, R. et al. (2010). Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving

receptors. *Proceedings of The National Academy Of Sciences*, 107(4), 1660-1665. doi: 10.1073/pnas.0907342107

[81] Liao, Z., Dong, J., Wu, W., Yang, T., Wang, T., & Guo, L. et al. (2012). Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B pathway. *Respiratory Research*, 13(1), 110. doi: 10.1186/1465-9921-13-110

[82] B. Hinz, The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell, *J. Biomech.* 43 (1) (2010) 146–155.

[83] B. Geiger, J.P. Spatz, A.D. Bershadsky, Environmental sensing through focal adhesions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (1) (2009) 21–33.

[84] M. Prager-Khoutorsky, A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, et al., Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing, *Nat. Cell Biol.* 13 (12) (2011) (1457-U1178).

[85] M. Chiquet, L. Gelman, R. Lutz, S. Maier, From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (5) (2009) 911–920.

[86] F. Klingberg, M.L. Chow, A. Koehler, S. Boo, L. Buscemi, T.M. Quinn, et al., Prestress in the extracellular matrix sensitizes latent TGF- $\beta$ 1 for activation, *J. Cell Biol.* 207 (2) (2014) 283–297.

[87] V. Sarrazy, A. Koehler, M.L. Chow, E. Zimina, C.X. Li, H. Kato, et al., Integrins  $\alpha$ v $\beta$ 5 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 promote latent TGF- $\beta$ 1 activation by human cardiac fibroblast contraction, *Cardiovasc. Res.* 102 (3) (2014) 407–417.